



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

사이토크롬 P450 의존적인 대사반응이 모화합물의

전자분무 이온화 질량분석법에 미치는 영향

Effects of cytochrome P450-dependent metabolism on

electrospray ionization mass spectrometry of

parent compounds

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

신 은 진

사이토크롬 P450 의존적인 대사반응이 모화합물의
전자분무 이온화 질량분석법에 미치는 영향

지도교수 오수진, 임형석

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2022년 2월

울산대학교 대학원
의과학과
신은진

신은진의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 오 수 진



심사위원 정 성 윤



심사위원 황 정 진



울 산 대 학 교 대 학 원

2022 년 2 월

감사의 글

지난 2 년동안 많은 분들의 도움으로 학위과정을 무사히 마무리할 수 있었습니다.

이 글을 통해서 도움을 주신 분들께 감사의 인사를 드리고자 합니다.

먼저 연구 방향을 제시해 주시고 변함없는 관심과 애정으로 세심하게 지도해 주신 오수진 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 교수님을 통해서 참된 연구자의 자세를 배울 수 있었습니다. 또한, 체계적으로 학문을 익힐 수 있었습니다. 부족함이 많고 배움이 더딘 저를 끝까지 이끌어 주며 한 단계 성장할 수 있는 발판을 만들어 주셔서 진심으로 감사드립니다. 졸업 후에도 교수님의 가르침을 기억하겠습니다.

또한 실험 과정, 결과 분석 및 논문 작성에 많은 도움을 주신 이지윤 박사님께 감사드립니다. 학위 과정 동안 항상 옆에서 멘토 역할을 해주시며 끊임없이 따뜻한 격려와 조언을 해 주신 덕분에 무사히 학위를 마무리할 수 있었습니다.

그리고 바쁘신 중에도 기꺼이 논문심사를 위해서 귀중한 시간을 내주시고 아낌없이 조언을 해 주신 정성윤 교수님과 황정진 교수님께도 다시 한번 감사의 말씀을 드립니다.

초 록

신약개발 초기 단계에서 대사체 연구는 약동학적 특성을 개선하기 위해 구조적으로 대사에 취약한 부분을 찾는 데에 초점을 둔다. 후기 단계에서는 중간 차를 비교함으로써 인간에서의 예측률을 높일 수 있는 독성시험에 적합한 동물 종을 찾기 위해 수행되고 있다. 2008년 Metabolites in Safety Testing (MIST) 가이드라인이 발표되면서 이러한 대사체의 정성적 분석뿐 아니라 정량적 분석이 강조되고 있다. 그러나 대사체 합성의 어려움으로 인해 대사체 표준품을 구하기 어려워 이를 정량하는 데에 그 한계가 존재한다. 본 연구에서는 액체 크로마토그래피 텐덤 질량분석기 (Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)를 이용하여 phase I 반응을 통해 생성되는 비교적 구조적 변화가 적은 대사체의 semi-quantification 방법을 검증하고자 하였다. 이를 위해 모화합물 28종과 이들 물질의 phase I 반응으로 생성되는 대사체 37종을 선정하였다. 총 65종 화합물을 LC-MS/MS의 multiple reaction monitoring (MRM) mode와 4개의 컬럼을 이용한 정량 분석법을 개발하였다. 또한 Korea Food and Drug Administration (KFDA) 밸리데이션 가이드라인에 따라 개발된 분석법을 검증하였다. 모화합물과 대사체의 이온화 정도는 area ratio로 구하였다. 대사체의 경우 모화합물과 대사체 각각의 MS 파라미터를 이용하여 분석 후 각 조건에 따른 area ratio 비율을 response factor (RF) 값으로 산출하였다. 실험 결과 phase I 반응을 통해 생성된 대사체 (37종) 중 7종의 물질 (1-hydroxy midazolam, lansoprazole sulfone *N*-oxide, ranitidine *N*-oxide, BR-A-535, resorufin, lansoprazole sulfide, dehydronifedipine) 을 제외한 30종 대사체 (약 81%)의 RF 값은 $\pm 30\%$ 오차 범위 내에 들어왔다. 오차 범위를 벗어난 물

질의 경우 모화합물과 그 대사체의 물리화학적, 구조적 특징 및 MS 파라미터를 비교하여 구조 변화에 따른 이온화 정도의 변화 원인을 파악하고자 하였다. 결론적으로 모화합물과 그 대사체의 pKa 값의 차이가 1 이상이거나, 조각 이온 (fragment ion) 구조 내의 chloride (Cl) 포함 유무 또는 *N*-/*S*-oxide 와 같은 구조적 특이성을 가지는 경우 모화합물과 대사체의 이온화 조건이 크게 달라짐을 확인하였다. 이러한 물리화학적 및 구조적 특징을 지니는 경우, 모화합물과 그 대사체의 최적화된 MS 파라미터 중 collision energy (CE) 값의 차이가 5 이상인 것으로 관찰되었다. 이상의 결과를 종합하면 대사체의 semi-quantification 한계를 극복하기 위해서는 특히 대사체의 물리화학적 및 구조적 특징에 따른 CE 값의 조정이 매우 중요함을 시사하고 있다.

목 차

초 록.....	i
표 목 록	v
그림 목 록.....	vi
약 어.....	vii
연구 배경.....	1
재료 및 방법	
1. 화학물질 및 시약들.....	6
2. LC-MS/MS 분석.....	6
2.1. 정량 분석법 개발을 위한 LC-MS/MS 장비 및 분석조건	6
2.2. 물질 제조 및 시험물질 검증.....	8
3. 데이터 분석.....	9
결과 및 고찰	
1. 정량분석법 개발	10
2. 정량분석법 검증	10
3. Phase I reaction (일상 대사 반응)에 의한 대사체의 semi-quantification 검증....	44
3.1. Response factor (RF).....	44
3.2. 물리화학적 특성에 따른 검증	46
3.3. 구조적 특성에 따른 검증.....	49
3.3.1. Chloride (Cl)	49
3.3.2. Sulfur (S)	52
3.3.3. Nitrogen (N).....	52

3.3.4 Dehydrogenation.....	52
3.4. MS 파라미터.....	55
결 론	57
참고문헌	60
부 록	66
Abstract	75

표 목 록

표 1. 선정된 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종) 목록	7
표 2. 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종)의 구조.....	11
표 3. 모화합물과 그 대사체의 MRM 과 MS 파라미터	18
표 4. 모화합물과 대사체의 정량분석 시 사용된 컬럼.....	20
표 5. 모화합물과 대사체의 정량분석을 위한 LC 분석조건.....	21
표 6. 모화합물과 대사체의 정량분석법 검증.....	40
표 7. 모화합물과 대사체의 조각 구조 내 chloride (Cl) 유무에 따른 RF 값.....	50

그림 목록

그림 1. MIST 가이드라인 개요.....	3
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우).....	23
그림 3. 대사체의 RF 값.....	45
그림 4. RF 값과 물리화학적 특성과의 상관관계.....	47
그림 5. Midazolam (A)과 대사체 (B)의 구조 및 MS/MS spectrum.....	51
그림 6. 구조에 sulfur (S) 포함된 화합물 및 대사체.....	53
그림 7. <i>N</i> -oxide 와 <i>N,S</i> -oxide 생성하는 화합물 및 대사체.....	54
그림 8. Dehydrogenation 반응하는 화합물과 대사체.....	54
그림 9. MS 파라미터와 RF와의 상관관계.....	56
그림 10. Semi-quantification 한계 극복을 위한 고려사항.....	59

약어

ACN	Acetonitrile
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
APPI	Atmospheric pressure photoionization
AUC	Area under the curve
CBZ	Carbamazepine
CE	Collision energy
Cl	Chloride
CXP	Collision cell exit potential
CYP450	Cytochrome P450
DP	Declustering potential
EP	Entrance potential
ESI	Electrospray ionization
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Flow injection analysis
GSH	Glutathione
HBA	Hydrogen bond acceptor
HBD	Hydrogen bond donor
ICH	International Council for Harmonisation
ISTD	Internal standard
KFDA	Korea Food and Drug Administration
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry

LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MIST	Metabolites in Safety Testing
MRM	Multiple reaction monitoring
N	Nitrogen
PD	Pharmacodynamics
PK	Pharmacokinetics
QC	Quality control
QTOF	Quadrupole time-of-flight
S	Sulfur
S/N	Signal to noise
STD	Standard
RF	Response factor
4-MUF	4-methylumbelliferone

연구 배경

약물대사연구는 선도물질 최적화 및 후보물질 도출 과정에서 약물의 운명을 결정하는데 중요한 역할을 담당한다.¹⁻⁴ 약물대사는 체내로 들어온 약물의 극성 및 수용성을 증가시켜 체외 배설을 용이하게 하는 반응으로 신약개발과정에서 약물의 약력학 (pharmacodynamics, PD) 및 약물동태(pharmacokinetics, PK)에 중요한 영향을 미친다.⁵⁻⁷ 약물대사가 너무 빠르게 진행되면 표적 조직에 원하는 치료 농도에 도달하지 못할 수도 있다. 반면 약물이 체외로 배설되지 않고 체내에 오래 머무른다면 의도치 않은 부작용 및 독성 (toxicity)을 유발할 가능성이 높다.⁸⁻¹⁰ 미국에서 가장 많이 처방된 의약품 200 개의 약물의 체외 배설 경로를 연구한 결과 약물 배설의 약 75%는 대사에 의해 발생하며, 특히 cytochrome P450 (CYP) 효소에 의한 약물 배설은 전체 55%를 차지한다.¹¹ 이러한 이유로 신약개발 초기 단계에서는 CYP 효소에 의한 약물대사 연구에 초점을 둔다. 약물대사는 주로 phase I 반응과 phase II 반응으로 구분된다. Phase I 반응은 산화 (oxidation), 환원 (reduction), 가수분해 (hydrolysis) 등을 통해 hydroxy group 나 amino group 등의 친수성 작용기를 첨가하는 반응이며 주로 CYP 약물대사효소에 의해 물질의 극성을 증가시켜준다. Phase II 반응은 친수성 분자와 공유결합하여 약물의 수용성을 증가시키는 반응으로 glucuronidation, sulfation, glutathione (GSH) conjugation 등의 반응이 있다.^{12, 13}

신약개발과정은 크게 약물탐색단계 (drug discovery)와 개발단계 (drug development)로 나뉜다. 탐색단계는 질병의 표적을 파악하고 선도물질의 PD, PK, 독성적 특성을 평가함으로써 이를 최적화하여 후보물질을 도출하는 단계이다. 개발단계에서는 비임상 및 임상시험에서 대상자의 안전성 및 효능을 확인한다.^{14, 15} 신약개발과정에서

의 약물대사 연구는 단계별로 그 목적이 다르다. 초기 약물탐색단계에서는 대사의 취약한 부분을 발견하여 의약화학자에게 구조적 정보를 제공함으로써 대사에 보다 안정한 물질을 합성하여 PK 특성을 개선하는데 그 목적을 두고 있다.¹⁶ 후기 단계에는 대사체의 중간 차이를 비교함으로써 사람과 유사한 대사체 프로파일을 가지는 동물종을 찾고자 한다. 이러한 동물종을 선택하여 비임상시험을 수행함으로써 사람에서의 결과를 예측률을 높이고자 한다.¹⁷ 신약개발 초기단계에서 약물대사 연구는 정성적 분석에 초점을 두었다면 후기단계에서는 독성적 측면에서의 대사 연구를 수행하기 위해 정성뿐만 아니라 정량적 분석이 강조되고 있다. 2008년 Food and Drug Administration (FDA)에서 Metabolites in Safety Testing (MIST) 가이드라인을 발표하였다.¹⁸ 이 가이드라인은 대사체의 area under the curve (AUC)가 모화합물 AUC의 10% 이상이고 그 대사체가 실험동물 중에서 발견되지 않은 경우 또는 동물 종에서 확인되었더라도 인간에 비해 낮은 농도로 존재할 경우 대사체의 전임상 자료를 요구하고 있다 (그림 1). 또한, ICH (International Council for Harmonisation)에서도 사람에게서 생성된 대사체의 노출에 관한 가이드라인(ICH M3 (R2))을 발표하면서 대사체 정량분석의 중요성이 더욱 증가되었다.¹⁹⁻²¹ 이와 같은 guidances 가 발표됨에 따라 약물개발과정에서 대사체 정량의 중요성이 더욱 강조되었으나 신약개발 탐색단계에서 대사체 합성이 쉽지 않아 현실적으로 대사체 정량분석에 있어 그 한계와 어려움이 존재한다.^{22, 23}

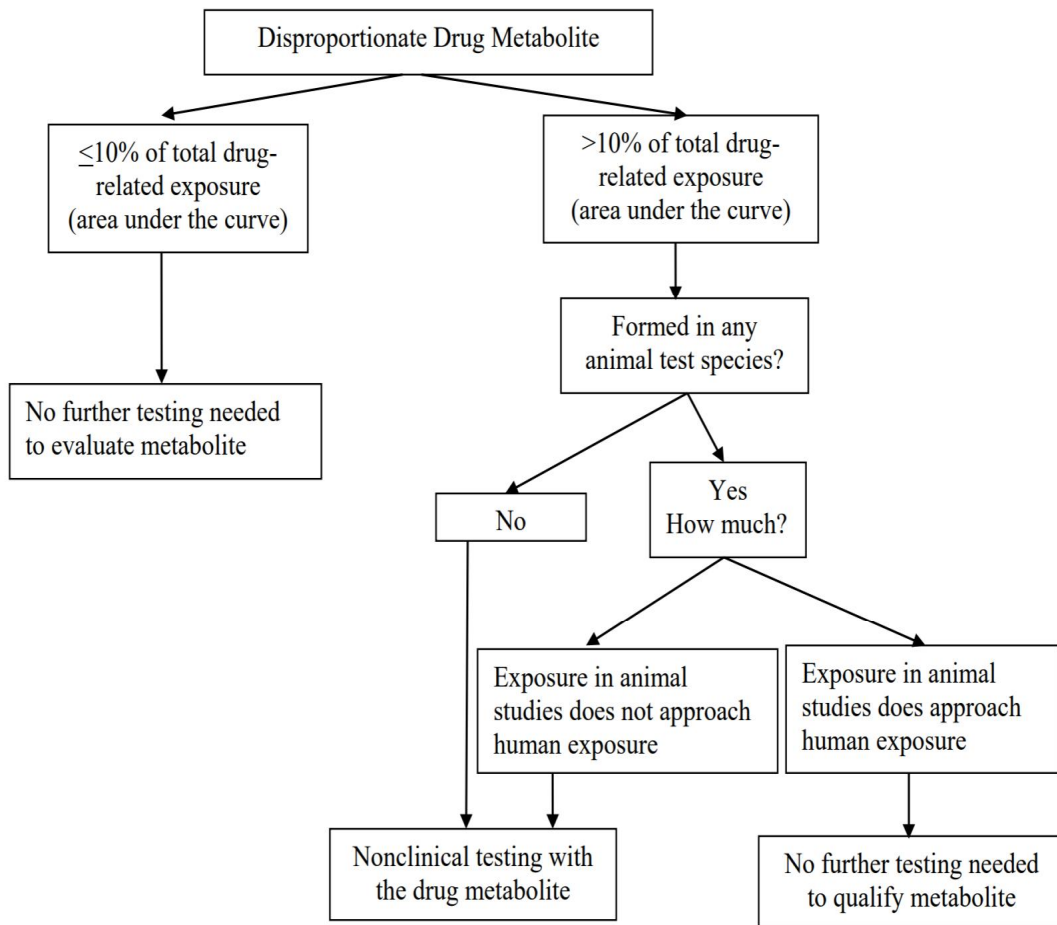


그림 1.MIST 가이드라인 개요

약물대사 연구에서는 다양한 분석장비를 tool 로 사용하는데, 주로 액체 크로마토그래피 텐덤 질량분석기 (Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)가 가장 많이 사용되고 있다.²⁴⁻²⁷ LC-MS/MS 는 질량 대 전하 (m/z) 비율을 기반으로 이온을 분석하여 이온화된 이온을 검출하거나 정량 분석하는 장비이며, 이는 시료도입부, 이온화 소스, mass 분석기, 검출기로 구성되어 있다.²⁸ 질량분석 장치에서는 타겟 물질의 이온화가 매우 중요한데, 이는 물질의 극성에 따라 이온화 방법이 전자 분무 이온화 (Electrospray ionization, ESI), 대기압 화학 이온화 (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 및 대기압 광이온화 (Atmospheric pressure photoionization, APPI)로 구분된다.²⁹ ESI 는 soft 이온화 기법이며 주로 극성 물질 분석에 사용한다.^{25,30, 31} 이와 같은 이온화 방법은 휘발성이 필요 없고 열에 안정한 편이며 용액상에서 이온을 형성하고 다중 하전 이온 (큰 분자의 분석이 가능함)을 형성하는 특징을 지닌다.³² 이러한 특성으로 ESI 이온화법은 다른 이온화 방법에 비해 적용 가능한 물질의 범위가 넓다.³³ 이온 소스에서 생성된 하전 이온은 질량분석관으로 이동되는데 이는 세 개의 quadrupole (Q1, Q2, Q3)로 이루어지며 다양한 스캔모드로 물질 분석이 가능하다. Q1 과 Q3 는 이온을 스캔하거나 필터를 하여 다양한 스캔모드로 설정이 가능하며 Q2 는 특정이온을 조각화하고 product ion 을 생성하기 위한 충돌에너지 (collision energy, CE)을 사용한다.³⁴ 다중 반응 모니터링 (Multiple reaction monitoring, MRM) 스캔모드는 Q1 에서 타겟 이온을 필터하여 Q2 에서 일정세기의 에너지를 주어 조각이온을 생성 후 조각 이온 중 민감도 및 특이적인 이온을 Q3 에서 필터하여 만든 Q1 과 Q3 의 질량을 쌍으로 만들며 주로 정량 분석에 사용된다.³⁵⁻³⁷ 이 스캔모드는 복잡한 생물학적 시료 중 타겟 물질 검출을 위

한 선택성과 민감성을 가진다.³⁸ MRM 모드에서 사용되는 MS 파라미터 (Mass spectrometry parameters)는 declustering potential (DP), entrance potential (EP), CE 및 collision cell exit potential (CXP)가 있으며, 물질에 따라 MS 파라미터를 최적화해야 한다.³⁹

약물대사 연구에서 대사체 정량분석의 중요성이 증가되고 있지만, 약물 초기단계 연구에서 대사체 합성의 어려움이 있다.^{40, 41} 이로 인해 약물 탐색 단계에서 대사체를 합성하지 않고 대사체를 모화합물의 분석법으로 분석하여 semi-quantification(반정량화)하는 경우가 많다.⁴¹⁻⁴³ Semi-quantification 은 모화합물과 구조적으로 유사한 대사체가 이온화 정도가 유사할 것이라 가정하고 모화합물 및 그 대사체를 분석하는 방법이다. 대사체 정량을 위한 semi-quantification 을 연구가 많이 수행되고 있으나 이 방법에 대한 검증연구는 매우 미흡하다. 일부 연구에서는 semi-quantification 을 평가하기 위해 정성분석용 장비인 액체 크로마토그래피 질량분석기 (Liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS) 및 quadrupole time-of-flight (QTOF) 장비를 이용, flow injection analysis (FIA)방법을 사용하거나 대사체의 물성을 통한 이온화 정도만 예측하는 in silico 방법으로 semi-quantification 을 평가하였다.^{22, 43-46}

본 연구에서는 모화합물과 이들 물질의 phase I 반응을 통해 생성되는 구조적으로 변형이 적은 대사체를 선정하여 LC-MS/MS 의 MRM mode 을 이용하여 대사체 분석을 위한 semi-quantification 방법의 평가 및 신뢰성 있는 검증법을 구축하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 화학물질 및 시약들

Phase I 반응 (oxidation, dealkylation, reduction, hydrogenation, dehydrogenation) 을 하는 28 종의 모화합물과 37 종의 대사체를 선정 후 이를 Cayman chemical (Ann Arbor MI, USA), Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI, USA)에서 구입하였다 (표 1). Dimethyl sulfoxide (DMSO, 99.7% purity), carbamazepine (CBZ, positive mode 에서의 내부표준품(Internal standard, ISTD) 물질로 사용)과 4-methylumbelliferone (4-MUF, negative mode 에서 ISTD 로 사용)는 Sigma-Aldrich 에서 구입하였고, formic acid (98% purity)는 Honeywell (Charlotte, NC, USA)에서 구입하였다. 아세토니트릴 (Acetonitrile, ACN)과 물 (water)은 HPLC grade 로 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다.

2. LC-MS/MS 분석

2.1. 정량 분석법 개발을 위한 LC-MS/MS 장비 및 분석조건

본 연구를 위한 정량분석 장비는 LC (Agilent 1290 series UPLC system)-MS/MS (API 5500 QTRAP hybrid triple-linear ion trap mass spectrometry, Turbo V™ Ion spray)를 사용하였다. MS 파라미터를 최적화하기 위해 모화합물과 그 대사체를 각각 50% ACN으로 용액을 제조 후 MS 에 주입하였고 물질에 따라 MS 의 polarity 를 positive 및 negative 모드를 사용하였다. 얻어진 MS 파라미터와 LC 를 연결 후 LC 조건을 최적화하기 위해서 4 개의 컬럼을 사용하였다. 사용된 컬럼은 Atlantis dC18

표 1. 선정된 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종) 목록

Biotransformation	Parent compound	Metabolite	
Oxidation	Bupropion	Hydroxybupropion	
	Midazolam	1-Hydroxy midazolam	
	Testosterone	6 β -Hydroxy testosterone	
	Paclitaxel	6 α -Hydroxy paclitaxel	
	Buspirone	6-Hydroxy buspirone	
	Mianserin	8-Hydroxy mianserin	
	Imipramine	2-Hydroxy imipramine	
	Lansoprazole		5-Hydroxy lansoprazole
			Lansoprazole sulfone <i>N</i> -Oxide
	Tamoxifen	4-Hydroxy tamoxifen	
	Fenbendazole	Fenbendazole sulfoxide	
	Ranitidine		Ranitidine <i>N</i> -Oxide
			Ranitidine <i>N,S</i> -Dioxide
			Ranitidine <i>S</i> -Oxide
	Coumarin	7-Hydroxy coumarin	
	Tolbutamide	4-Hydroxy tolbutamide	
	Chlorzoxazone	6-Hydroxy chlorzoxazone	
	Diclofenac		4'-Hydroxy diclofenac
			3'-Hydroxy-4'-methoxy diclofenac
	Warfarin		4-Hydroxy warfarin
6-Hydroxy warfarin			
Fimasartan		2-Hydroxy-butyl fimasartan	
		BR-A-535	
Dealkylation	Phenacetin	Acetaminophen	
	Amodiaquine	<i>N</i> -Desethyl amodiaquine	
	Prazosin	2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline	
	Metoclopramide	<i>O</i> -Desmethyl metoclopramide	
	7-Ethoxyresorufin	Resorufin	
	Berberine		Berberrubine
			Demethyleneberberine
	Clarithromycin	<i>N</i> -Desmethylclarithromycin	
	Verapamil	Norverapamil	
	Dextromethorphan	Dextrorphan	
	Imatinib	<i>N</i> -Desmethyl imatinib	
Reduction	Lansoprazole	Lansoprazole sulfide	
Hydrogenation	Berberine	Jatrorrhizine	
Dehydrogenation	Nifedipine	Dehydronifedipine	

column (2.1X50 mm i.d., 3 μ m, Waters, Milford, MA), Atlantis T3 column (2.1 x 100 mm i.d., 3 μ m, Waters, Milford, MA), XTerra MS C18 column (2.1X50 mm i.d., mm, 5 μ m, Waters, Milford, MA) 및 Hypersli Gold column (2.1X150 mm i.d., mm, 5 μ m, Thermo Fisher)이다. 이동상으로 사용된 ACN 과 Water 에 각각 0.1% formic acid 를 첨가하여 사용하였다.

2.2. 물질 제조 및 시험물질 검증

정량분석시험에 사용된 28 종의 모화합물과 37 종의 대사체는 각각 최종 농도 10 mM 로 칭량 후 DMSO 로 용해하여 실험 전까지 -80°C 에 보관하였다. 정량분석법 검증을 위하여 식품의약품안전처의 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인에 따라 특이성 (Specificity), 범위 (Range), 직선성 (Linearity), 검출한계 (Limit of detection, LOD), 정량한계 (Limit of quantification, LOQ), 정밀성 (Precision) 및 정확성(Accuracy) 조사하였다.⁴⁷ 모화합물과 대사체의 시험분석법을 검증하기 위하여 이를 각각 혼합하여 표준액 (Standard(STD) solution) 및 품질관리 (Quality control, QC) 시료를 제조하였다. 이 혼합물의 표준액 최종 농도는 0.244-1000 nM 와 100 nM 의 QC 시료를 50% ACN 으로 제조하였다. 내부표준물질은 positive mode 에서는 carbamazepine 을 사용하였고 negative mode 은 4-methylumbelliferone 을 사용하였다. 모화합물과 대사체의 STD 와 QC 시료는 MRM 으로 정량분석하였다.

3. 데이터 분석

모화합물 및 대사체를 모화합물 정량분석조건과 대사체 (metabolite authentic compound) 정량분석조건으로 각각 정량분석 후 area ratio를 구했다. Area ratio는 MultiQuant 3.0.3 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) 소프트웨어를 사용하였다. Area ratio로부터 아래의 response factor (RF)식으로 계산하였다 (수식 1). RF 공식은 Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA)에서 계산하였다.

$$\text{Response factor (RF)} = \frac{\text{Area ratio of Meatbolite (metabolite MS condition)}}{\text{Area ratio of Meatbolite (parent compound MS condition)}} \quad (1)$$

RF 값이 오차범위를 벗어난 물질은 모화합물과 대사체를 이온화에 영향을 주는 물리화학적, 구조적 특성을 비교하여 구조 변화에 따른 ESI 반응에 상관성을 확인하였다.^{48, 49} 모화합물과 대사체의 16 가지의 물리화학적 특징 (pKa, logP, polar surface area, molecular volume, 등)을 Marvin (ChemAxon, Zhony, Budapest, Hungary)과 Physchem (Mestrelab research, Santiago, Galicia, Spain) 소프트웨어를 이용하여 비교 및 확인하였다. Chemdraw (Cambridge Soft, Cambridge, Mass, USA)을 사용해서 구조적 차이도 비교하였다. 또한 MS 파라미터 (DP, EP, CE, CXP)도 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 정량분석법 개발

Phase I 반응을 하는 모화합물과 대사체를 LC-MS/MS 를 사용하여 MS 및 LC 조건에 최적화하였다. 표 2 는 모화합물 (28 종)과 그 대사체 (37 종)의 구조이다. 표 3 은 모화합물과 대사체의 정량분석을 위한 최적화 된 MRM 및 MS 파라미터이다. 모화합물과 그 대사체의 정량분석 위한 4 개의 컬럼 (표 4)을 사용하여 LC 조건 (표 5)을 최적화하였다. 28 종의 모화합물과 37 종의 대사체 정량분석법을 개발하였다 (그림 2).

2. 정량분석법 검증

모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종)의 정량분석법을 검증하기 위해서 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 범위 7 가지 항목을 확인하였다. 개발된 정량분석법은 KFDA 밸리데이션 가이드라인 기준을 충족하였다. 특이성은 chromatogram 을 통해 확인하였다(그림 2). 나머지 항목들은 표 6 에 정리하였다. 모화합물과 대사체의 각 농도별대로 단계적으로 조제하여 LC-MS/MS 분석하여 피크 면적비에 대한 농도비의 관계를 표준 검량선을 작성하였고 범위는 0.244-1000nM 의 농도범위에서 2 회 분석하여 작성한 검량선으로부터 직선성의 상관계수(r)을 구하였으며 이는 0.999 이상 높은 직선성을 보였다. 검출한계는 S/N ratio(signal to noise, 신호 대 잡음비)가 3:1 로, 정량한계는 10:1 로 설정하였다. 정확성은 설정농도의 $\pm 15\%$ 인 80~120% 안에 들어왔으며, %CV 가 ± 15 범위에 들어와서 정밀성도 확인하였다.

표 2. 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종)의 구조

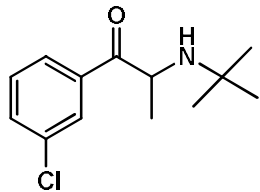
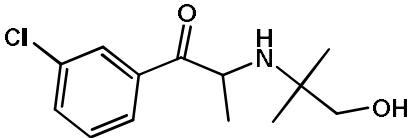
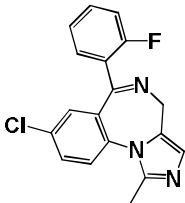
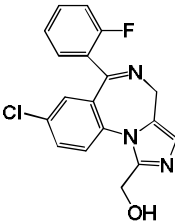
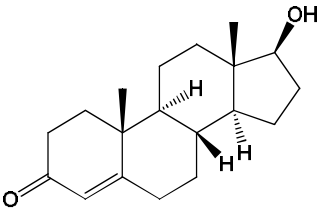
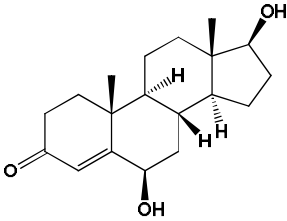
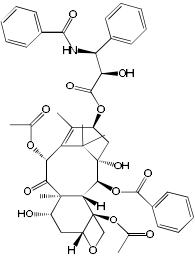
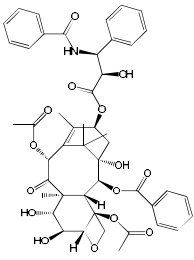
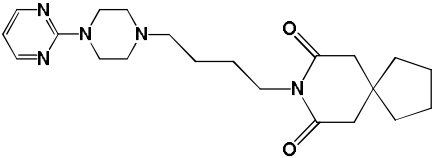
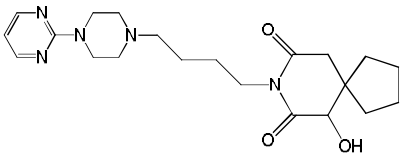
Oxidation	
Parent compound	Metabolite
Bupropion 	Hydroxybupropion 
Midazolam 	1-Hydroxy midazolam 
Testosterone 	6β-Hydroxy testosterone 
Paclitaxel 	6α-Hydroxy paclitaxel 
bupirone 	6-Hydroxy bupirone 

표 2. 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종)의 구조 (계속)

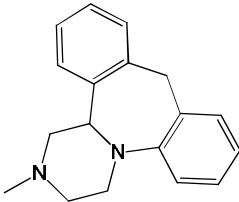
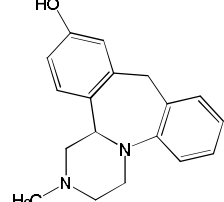
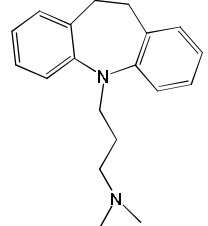
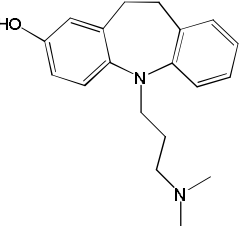
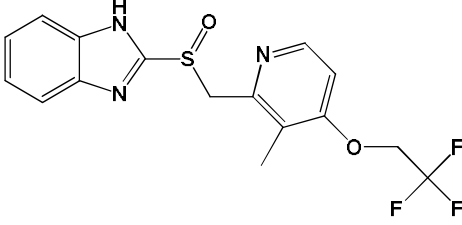
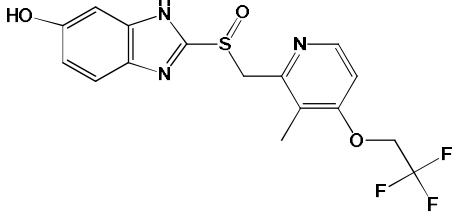
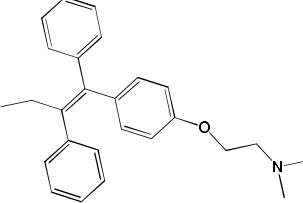
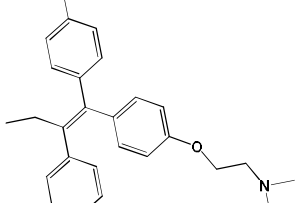
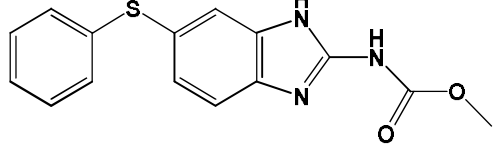
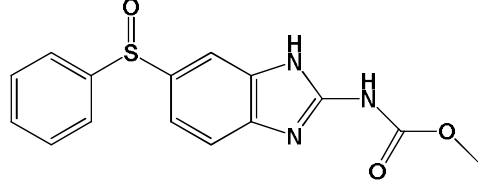
Mianserin	8-Hydroxy mianserin
	
Imipramine	2-Hydroxy imipramine
	
Lansoprazole	5-Hydroxy lansoprazole
	
	Lansoprazole sulfone <i>N</i> -Oxide
Tamoxifen	4-Hydroxy tamoxifen
	
Fenbendazole	Fenbendazole sulfoxide
	

표 2. 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종)의 구조 (계속)

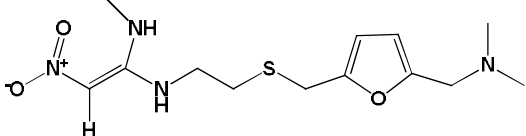
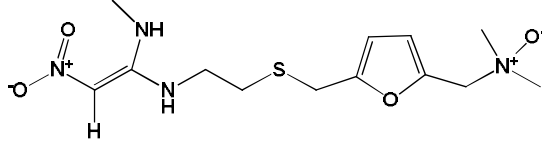
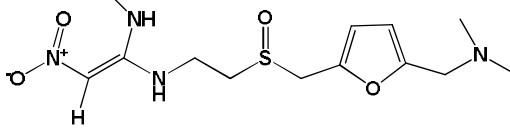
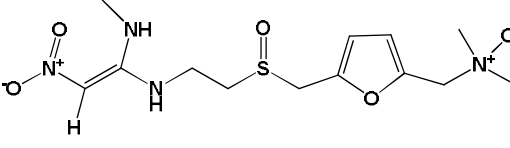
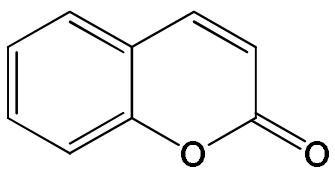
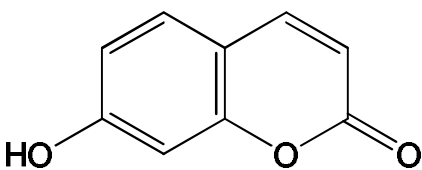
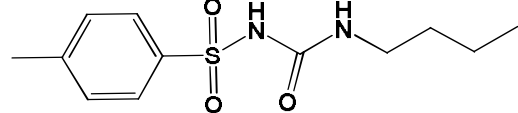
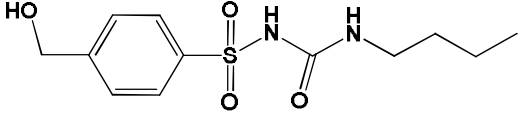
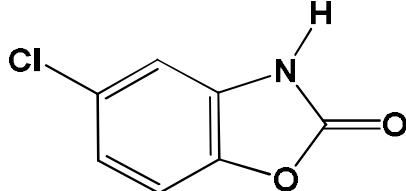
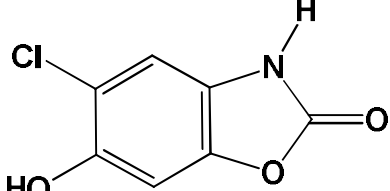
Ranitidine	Ranitidine <i>N</i> -Oxide
	
	Ranitidine <i>S</i> -Oxide
	
Ranitidine <i>N,S</i> -Dioxide	
Coumarin	7-Hydroxy coumarin
	
Tolbutamide	4-Hydroxy tolbutamide
	
Chlorzoxazone	6-Hydroxy chlorzoxazone
	

표 2. 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종)의 구조 (계속)

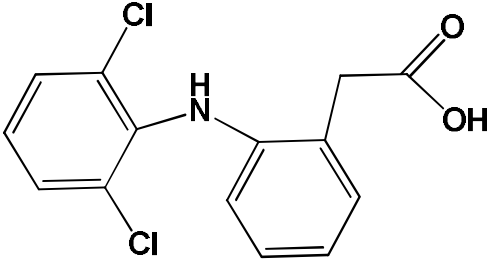
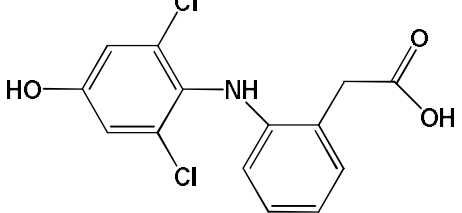
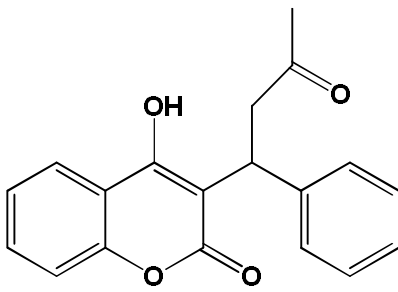
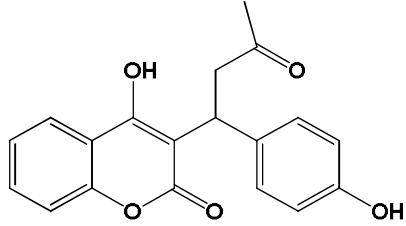
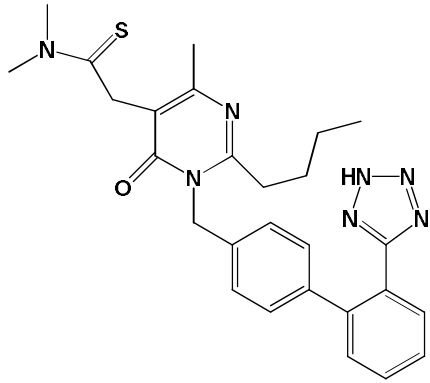
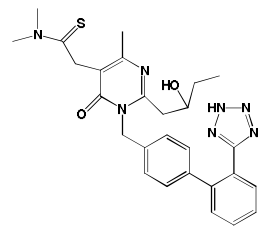
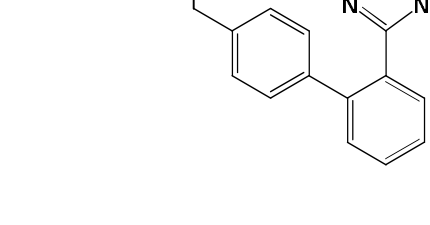
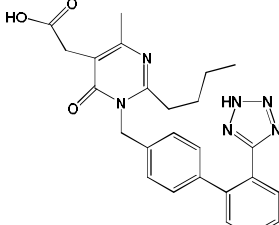
Diclofenac	4'-Hydroxy diclofenac
	
Warfarin	4-Hydroxy warfarin
	
Fimasartan	2-Hydroxy-butyl fimasartan
	
BR-A-535	BR-A-535
	

표 2. 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종)의 구조 (계속)

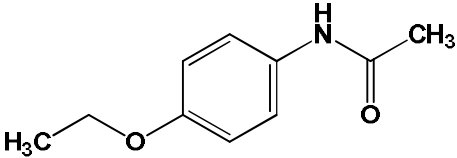
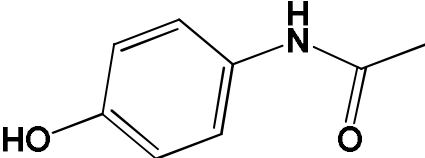
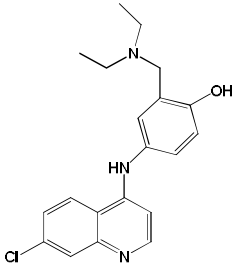
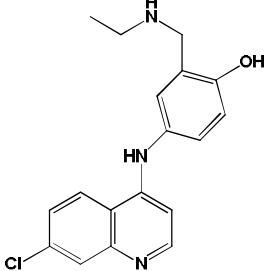
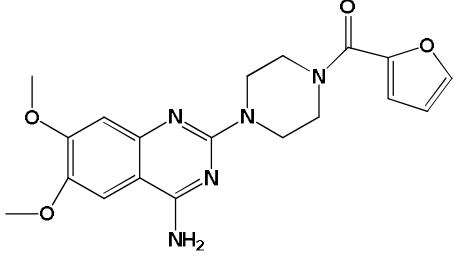
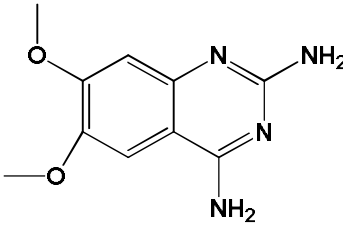
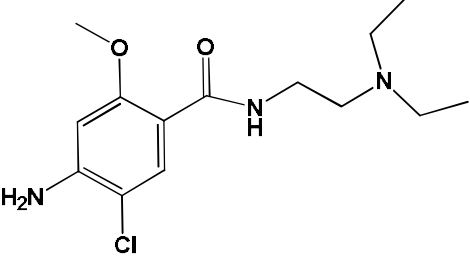
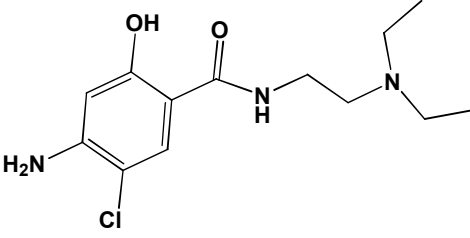
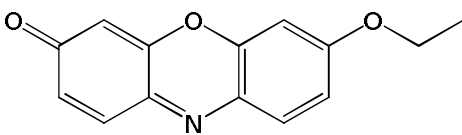
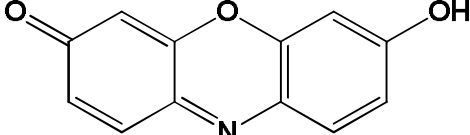
Dealkylation	
Parent compound	Metabolite
Phenacetin 	Acetaminophen 
Amodiaquine 	N-Desethyl amodiaquine 
Prazosin 	2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline 
Metoclopramide 	O-Desmethyl metoclopramide 
7-Ethoxyresorufin 	Resorufin 

표 2. 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종)의 구조 (계속)

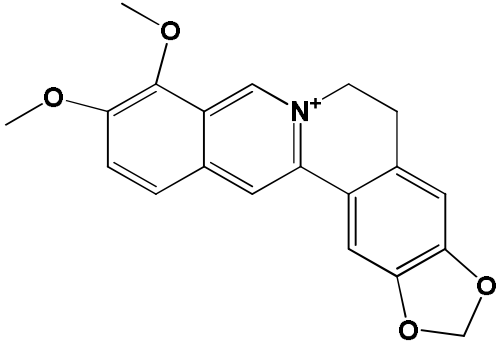
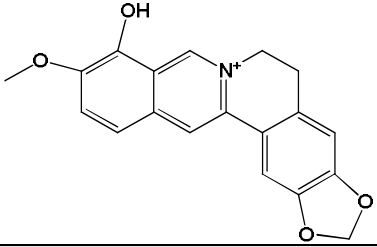
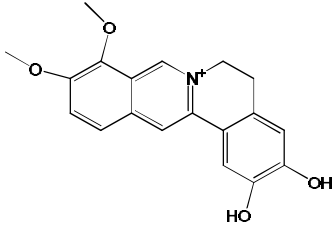
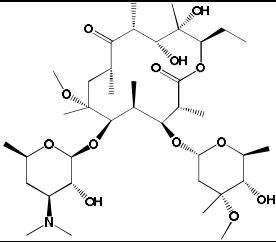
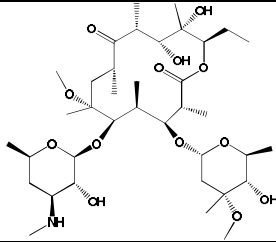
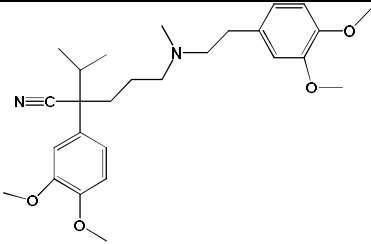
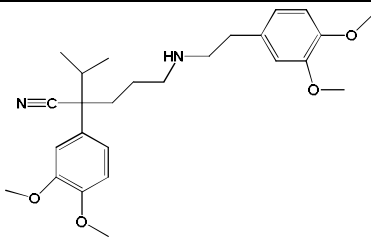
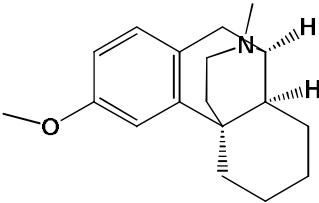
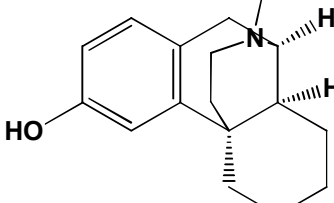
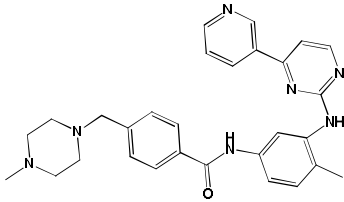
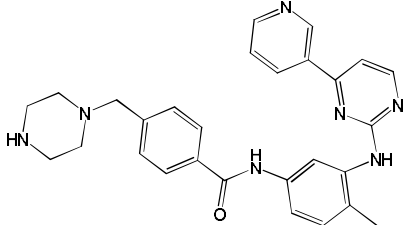
Berberine	Berrubine
	
	Demethyleneberberine
	
Clarithromycin	N-Desmethyl clarithromycin
	
verapamil	Norverapamil
	
Dextromethorphan	Dextrorphan
	
Imatinib	N-Desmethyl imatinib
	

표 2. 모화합물 (28 종)과 대사체 (37 종)의 구조 (계속)

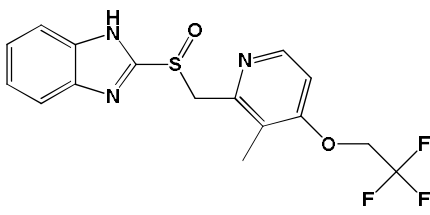
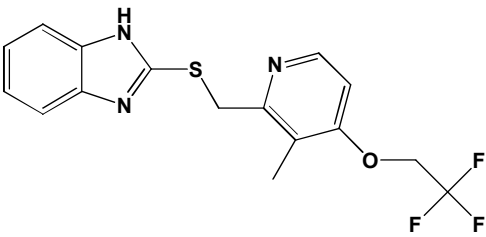
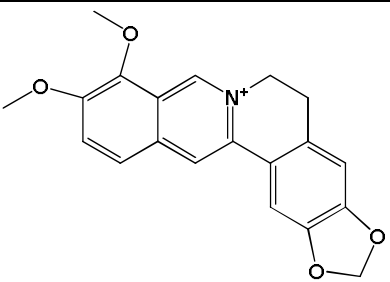
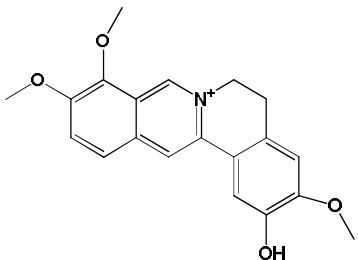
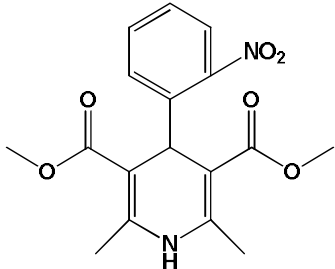
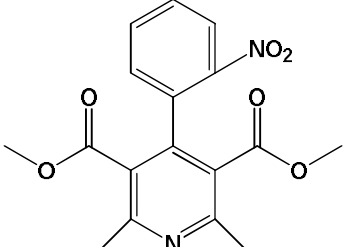
Reduction	
Parent compound	Metabolite
Lansoprazole	Lansoprazole sulfide
	
Hydrogenation	
Parent compound	Metabolite
Berberine	Jatrorrhizine
	
Dehydrogenation	
Parent compound	Metabolite
Nifedipine	Dehydronifedipine
	

표 3. 모화합물과 그 대사체의 MRM 과 MS 파라미터

Parent compound	MRM	MS parameters				Metabolite	MRM	MS parameters			
		DP	EP	CE	CXP			DP	EP	CE	CXP
Bupropion	240 > 184	70	10	17	13	Hydroxybupropion	256 > 238	121	10	19	12
Midazolam	326 > 291	118	10	39	15	1-Hydroxy midazolam	342 > 324	106	10	29	18
Testosterone	289 > 97	101	10	33	8	6β-Hydroxy testosterone	305 > 157	120	10	36	15
Paclitaxel	854 > 286	131	10	27	18	6α-Hydroxy Paclitaxel	870 > 286	131	10	23	16
buspirone	386 > 122	86	10	42	13	6-Hydroxy buspirone	402 > 122	80	10	42	13
Mianserin	265 > 208	181	10	29	14	8-Hydroxy mianserin	281 > 224	180	10	35	15
Imipramine	281 > 86	70	10	23	13	2-Hydroxy imipramine	297 > 86	80	10	23	13
Lansoprazole	370 > 252	50	10	15	9	5-Hydroxy lansoprazole	386 > 252	78	10	16	7
						Lansoprazole sulfone <i>N</i> -Oxide	402 > 119	27	10	27	13
						Lansoprazole sulfide	354 > 236	78	10	33	13
Tamoxifen	372 > 72	181	10	29	10	4-Hydroxy tamoxifen	388 > 72	201	10	47	8
Fenbendazole	300 > 268	170	10	29	13	Fenbendazole sulfoxide	316 > 191	200	10	30	13
Ranitidine	315 > 176	28	10	23	13	Ranitidine <i>N</i> -Oxide	331 > 270	36	10	17	14
						Ranitidine <i>S</i> -Oxide	331 > 138	61	10	23	12
						Ranitidine <i>N,S</i> -Dioxide	347 > 192	16	10	25	12
Coumarin	147 > 103	126	10	25	10	7-Hydroxy coumarin	163 > 91	100	10	25	10
Tolbutamide	269 > 170	-65	-10	-24	-13	4-Hydroxy tolbutamide	285 > 186	-65	-10-	-26	-9
Chlorzoxazone	168 > 132	-120	-10	-28	-11	6-hydroxy chlorzoxazone	184 > 120	-70	-10	-26	-9

표 3. 모화합물과 그 대사체의 MRM 과 MS 파라미터 (계속)

Parent compound	MRM	MS parameters				Metabolite	MRM	MS parameters			
		DP	EP	CE	CXP			DP	EP	CE	CXP
Diclofenac	294 > 250	-40	-10	-15	-15	4'-Hydroxy diclofenac	310 > 266	-70	-10	-17	-15
						3'-Hydroxy-4'-methoxy diclofenac	340 > 260	-35	-10	-14	-15
Warfarin	307 > 161	-60	-10	-28	-11	4-Hydroxy warfarin	323 > 161	-20	-10	-30	-13
						6-Hydroxy warfarin	323 > 177	-135	-10	-30	-11
Fimasartan	500 > 221	-55	-10	-46	-13	2-Hydroxy butyl fimasartan	516 > 237	-50	-10	-37	-15
						BR-A-535	457 > 179	-67	-10	-26	-11
Phenacetin	180 > 110	116	10	26	13	Acetaminophen	152 > 110	40	10	23	13
Amodiaquine	356 > 177	76	10	71	12	<i>N</i> -Desethyl amodiaquine	328 > 219	136	10	67	16
prazosin	384 > 247	121	10	39	12	2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline	221 > 205	161	10	37	16
Metoclopramide	300 > 227	26	10	31	20	<i>O</i> -Desmethyl metoclopramide	286 > 213	51	10	27	14
7-Ethoxyresorufin	242 > 214	121	10	31	10	Resorufin	214 > 186	166	10	37	12
Berberine	336 > 320	120	10	39	13	Berberrubine	322 > 307	110	10	39	13
						Demethyleneberberine	342 > 308	100	10	38	13
						Jatrorrhizine	338 > 322	110	10	38	13
Clarithromycin	748 > 158	31	10	35	12	<i>N</i> -Desmethyl clarithromycin	734 > 144	71	10	33	13
verapamil	455 > 165	89	10	37	13	Norverapamil	441 > 165	160	10	34	13
Dextromethorphan	272 > 171	161	10	57	12	Dextrorphan	258 > 157	180	10	44	13
imatinib	494 > 394	88	10	37	13	<i>N</i> -Desmethyl imatinib	480 > 394	88	10	36	13
Nifedipine	347 > 254	141	10	27	14	Dehydronifedipine	345 > 284	186	10	39	8

표 4. 모화합물과 대사체의 정량분석 시 사용된 컬럼

Column	Polarity	Parent compound	Metabolite
Atlantis dC18 2.1X50 mm, 3 um	Positive	Bupropion	Hydroxybupropion
		Midazolam	1-Hydroxy midazolam
		testosterone	6β-Hydroxy testosterone
		Buspirone	6-hydroxy buspirone
		Mianserin	8-Hydroxy mianserin
		Imipramine	2-Hydroxy imipramine
		Phenacetin	Acetaminophen
		Prazosin	2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline
		Metoclopramide	<i>O</i> -Desmethyl metoclopramide
		Berberine	Berberrubine
			Demethyleneberberine
		Clarithromycin	Jatrorrhizine <i>N</i> -Desmethyl clarithromycin
		Verapamil	Norverapamil
		Dextromethorphan	Dextrorphan
		Imatinib	<i>N</i> -Desmethyl imatinib
		Fenbendazole	Fenbendazole sulfoxide
	Nifedipine	Dehydronifedipine	
Coumarin	7-Hydroxy coumarin		
Amodiaquine	<i>N</i> -Desethyl amodiaquine		
Negative	Tolbutamide	4-Hydroxy tolbutamide	
Atlantis T3 2.1 x 100 mm, 3 um	Positive	7-Ethoxyresorufin	Resorufin
	Negative	Chlorzoxazone	6-Hydroxy chlorzoxazone
XTerra MS C18 2.1X50 mm, 5 um	Positive	Paclitaxel	6α-Hydroxy Paclitaxel
		Tamoxifen	4-Hydroxy tamoxifen
		Lansoprazole	5-Hydroxy lansoprazole
		Lansoprazole	Lansoprazole sulfone <i>N</i> -Oxide Lansoprazole sulfide
	Negative	Diclofenac	4'-Hydroxy diclofenac
			3'-Hydroxy-4'-methoxy diclofenac
		Warfarin	4-Hydroxy warfarin
			6-Hydroxy warfarin
Fimasartan	2-Hydroxy butyl fimasartan BR-A-535		
Hypersil Gold C8 2.1 x 150 mm, 5 um	Positive	Ranitidine	Ranitidine <i>N</i> -Oxide
			Ranitidine <i>S</i> -Oxide
			Ranitidine <i>N,S</i> -Dioxide

표 5. 모화합물과 대사체의 정량분석을 위한 LC 분석조건

1. Atlantis dC18 (2.1X50 mm, 3 um)

HPLC system	Agilent 1290 series HPLC system equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment			
Column	Waters, Atlantis dC18 2.1X50 mm, 3 um			
Mobile Phase	A : 0.1% Formic acid in water B : 0.1% Formic acid in Acetonitrile			
Gradient	Time (min)	% A	% B	
	0.2	100	0	
	1.0	100	0	
	2.0	50	50	
	4.0	50	50	
	4.5	5	95	
	6.0	5	95	
	6.5	100	0	
9.0	100	0		
Column temperature	30 °C			
Flow rate	0.4 ml/min			
Run time	9 min			

2. Atlantis T3 (2.1 x 100 mm, 3 um)

HPLC system	Agilent 1290 series HPLC system equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment			
Column	Waters, Atlantis T3 2.1 x 100 mm, 3 um			
Mobile Phase	A : 0.1% Formic acid in water B : 0.1% Formic acid in Acetonitrile			
Gradient	Time (min)	% A	% B	
	2.0	100	0	
	2.5	50	50	
	5.0	50	50	
	5.5	5	95	
	7.0	5	95	
	7.1	100	0	
	11.0	100	0	
Column temperature	30 °C			
Flow rate	0.4 ml/min			
Run time	11 min			

표 5. 모화합물과 대사체의 정량분석을 위한 LC 분석조건 (계속)

3. XTerra MS C18 (2.1X50 mm, 5um)

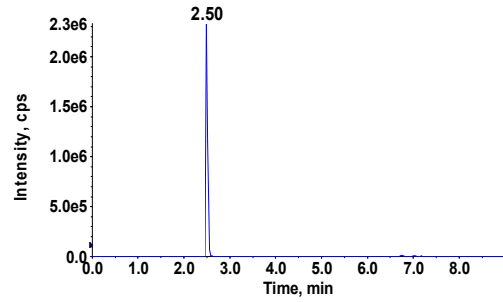
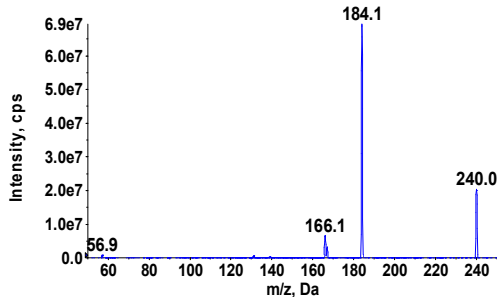
HPLC system	Agilent 1290 series HPLC system equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment			
Column	Waters, XTerra MS C18 2.1X50 mm, 5um			
Mobile Phase	A : 0.1% Formic acid in water B : 0.1% Formic acid in Acetonitrile			
Gradient	Time (min)	% A	% B	
	0.2	95	5	
	1.0	95	5	
	2.0	5	95	
	4.0	5	95	
	4.5	95	5	
	7.0	95	5	
Column temperature	30 °C			
Flow rate	0.4 ml/min			
Run time	7 min			

4. Hypersil Gold C8 (2.1 x 150 mm, 5 um)

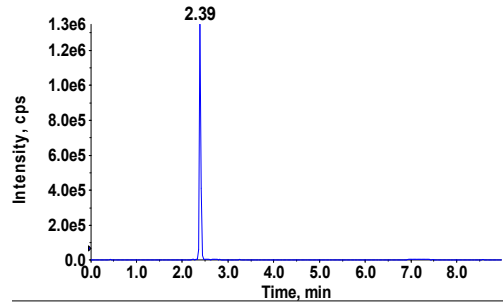
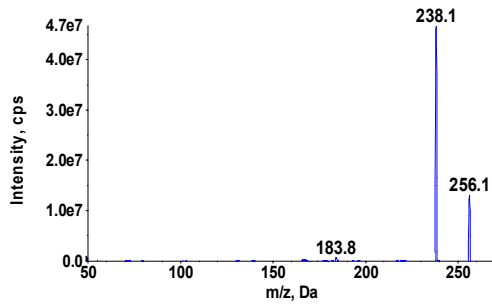
HPLC system	Agilent 1290 series HPLC system equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment			
Column	Thermo scientific, Hypersil Gold C8 2.1 x 150 mm, 5 um			
Mobile Phase	A : 0.1% Formic acid in water B : 0.1% Formic acid in Acetonitrile			
Gradient	Time (min)	% A	% B	
	1.5	99	1	
	5.0	50	50	
	8.0	0	100	
	8.5	99	1	
	11.0	99	1	
Column temperature	30 °C			
Flow rate	0.25 ml/min			
Run time	11 min			

1.

Bupropion

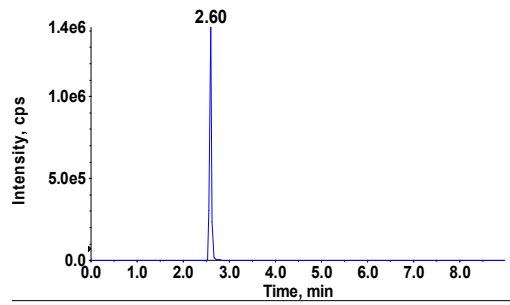
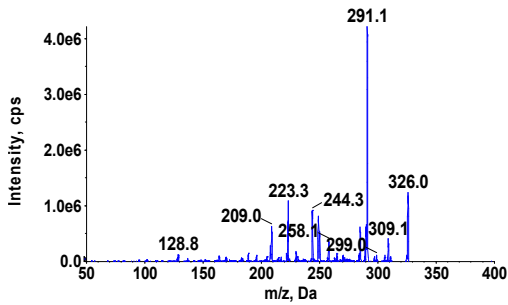


Hydroxybupropion



2.

Midazolam



1-Hydroxy midazolam

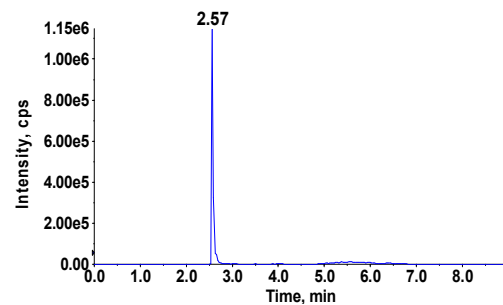
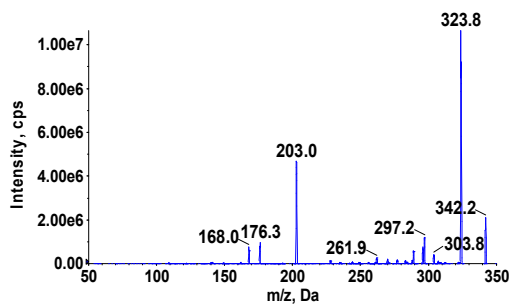
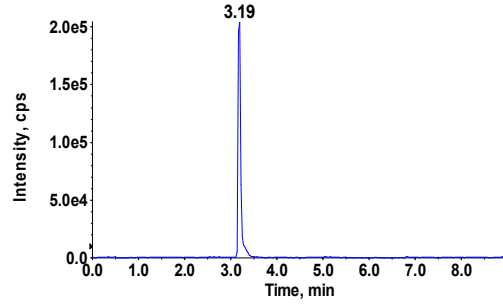
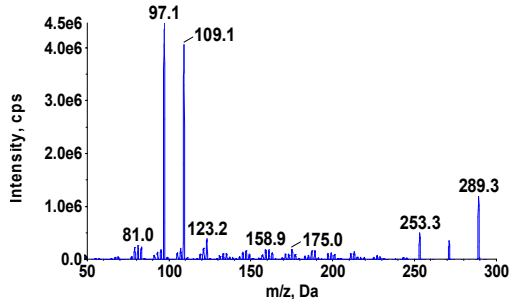


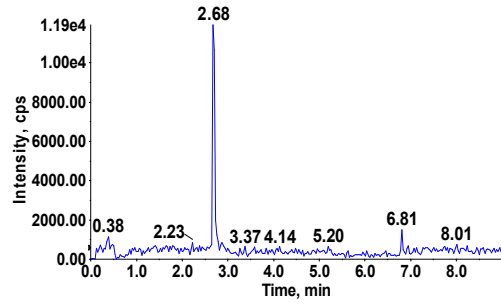
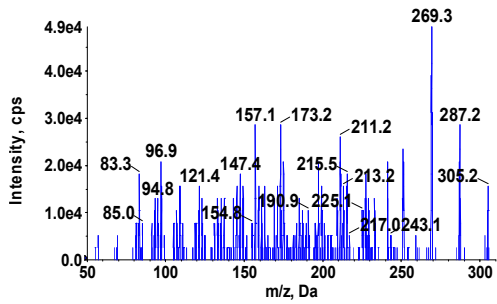
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우)

3.

Testosterone

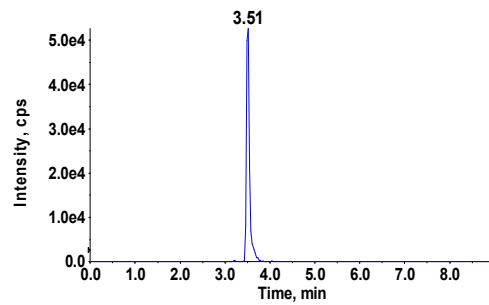
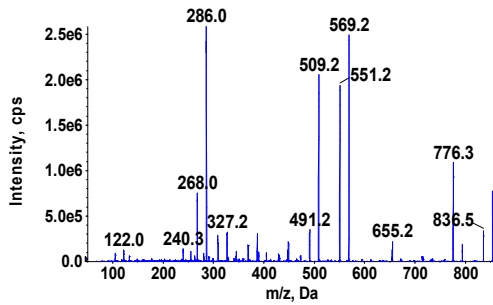


6 β -Hydroxy testosterone



4.

Paclitaxel



6 α -Hydroxy paclitaxel

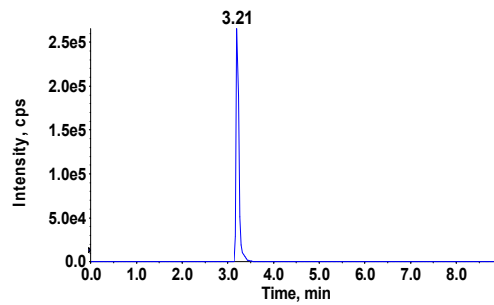
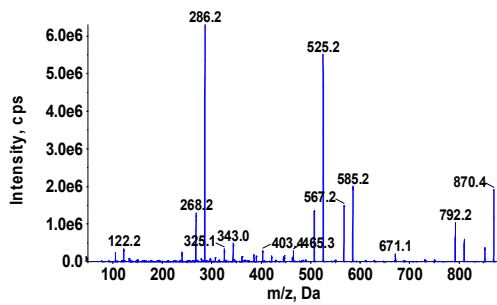
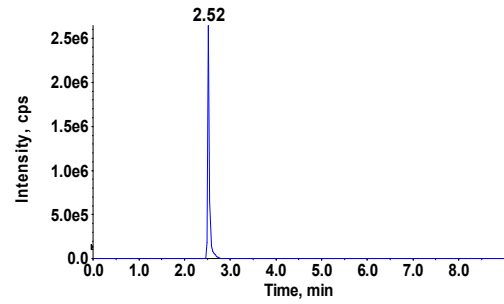
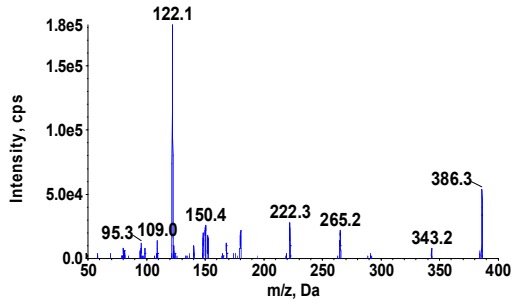


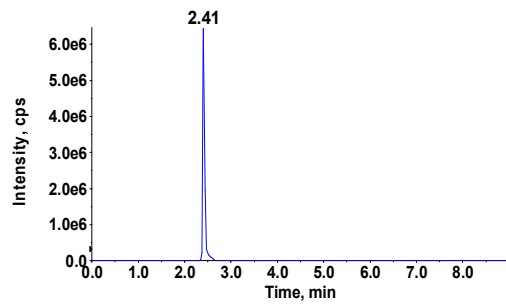
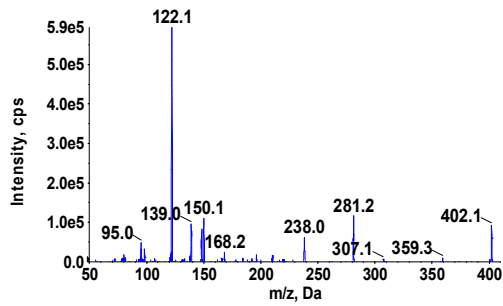
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

5.

Buspirone

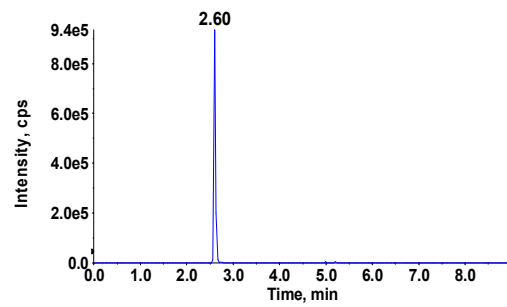
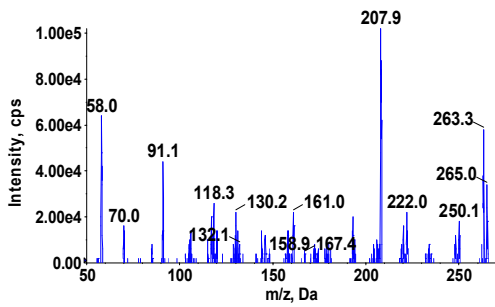


6-Hydroxy buspirone



6.

Mianserin



8-Hydroxy mianserin

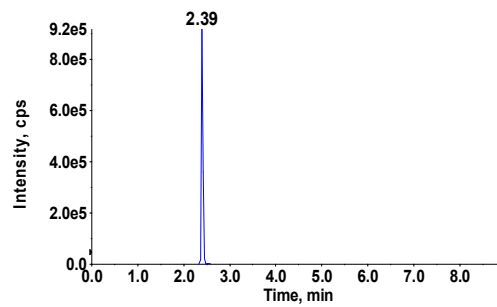
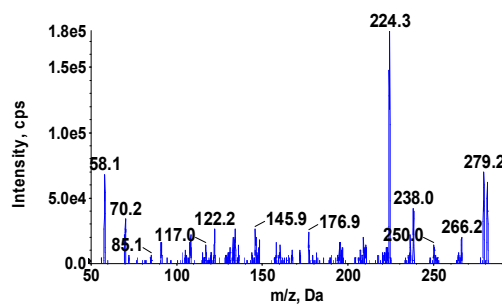
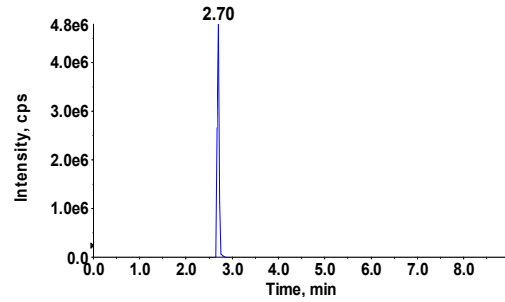
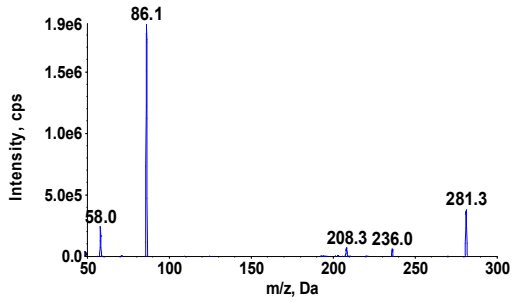


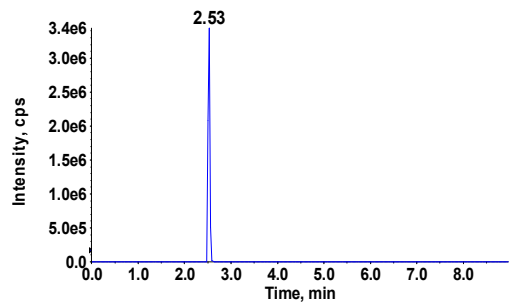
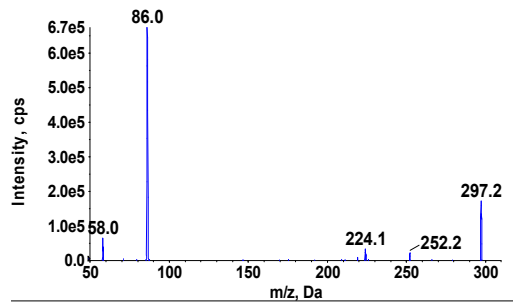
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

7.

Imipramine

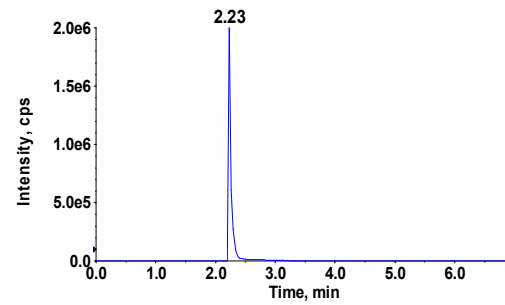
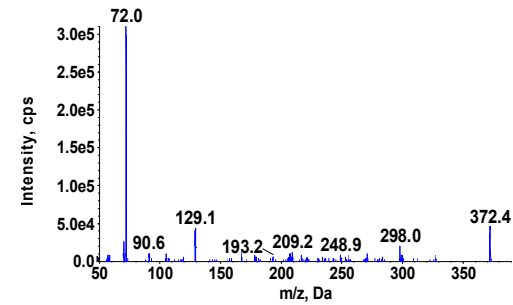


2-Hydroxy imipramine



8.

Tamoxifen



4-Hydroxy tamoxifen

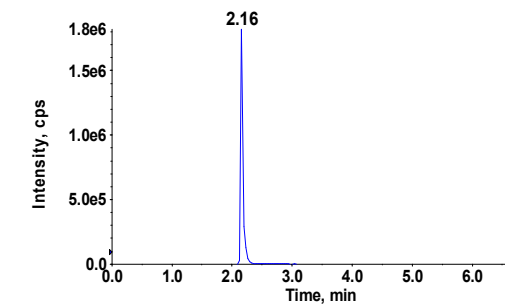
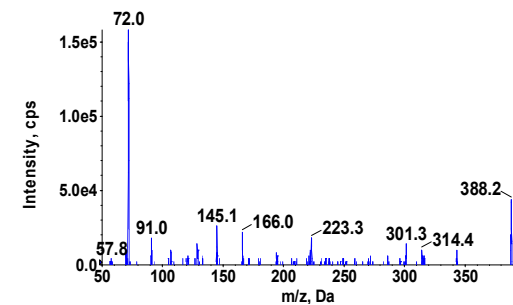
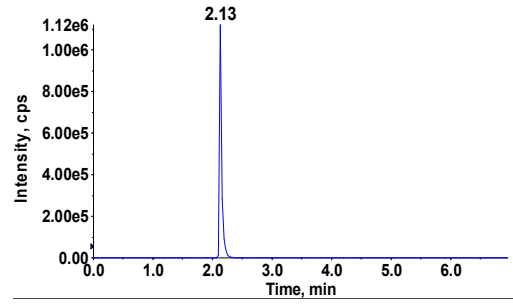
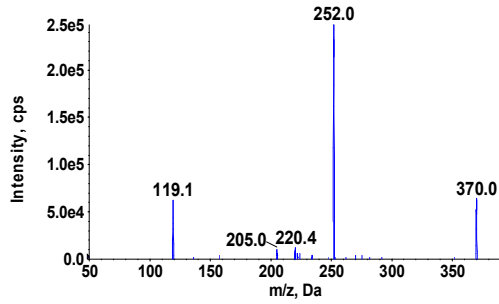


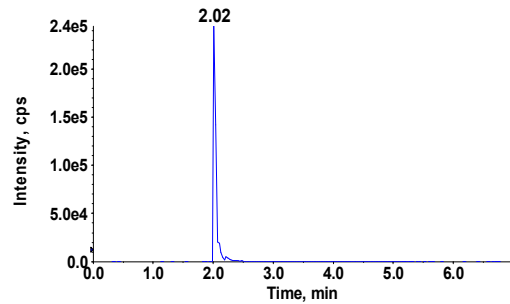
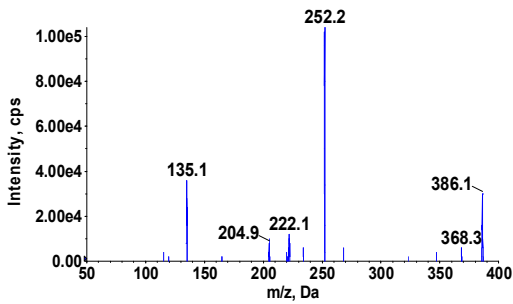
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

9.

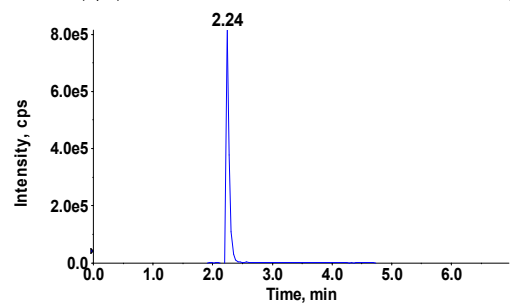
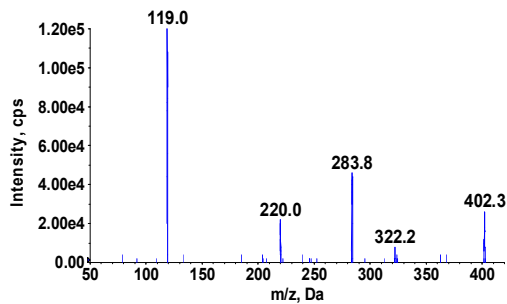
Lansoprazole



5-Hydroxy lansoprazole



Lansoprazole sulfone N-Oxide



Lansoprazole sulfide

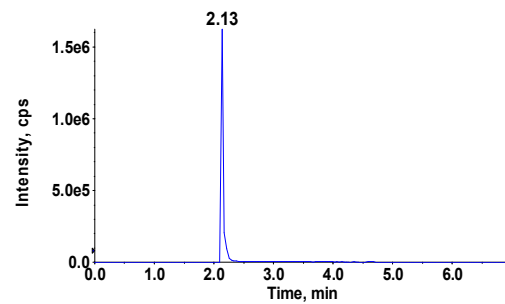
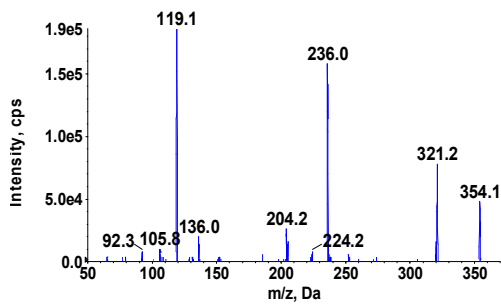
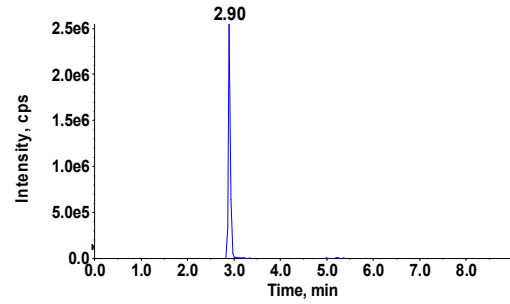
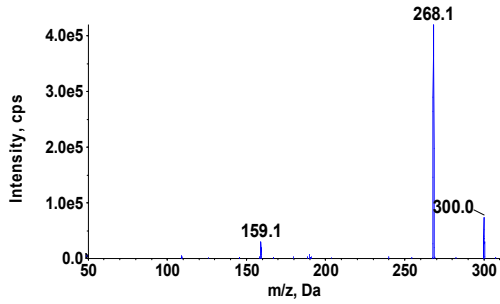


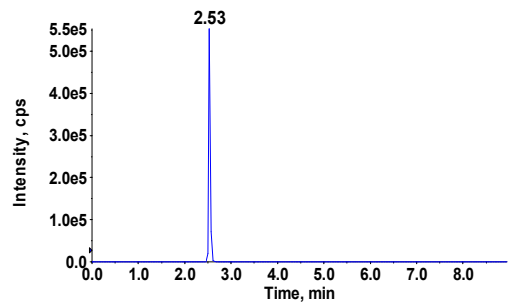
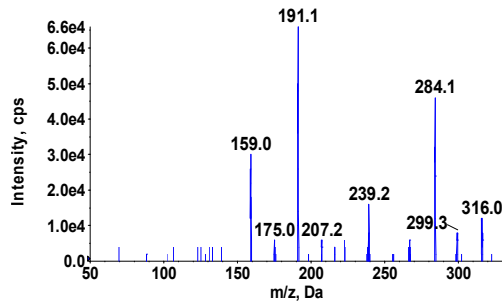
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

10.

Fenbendazole

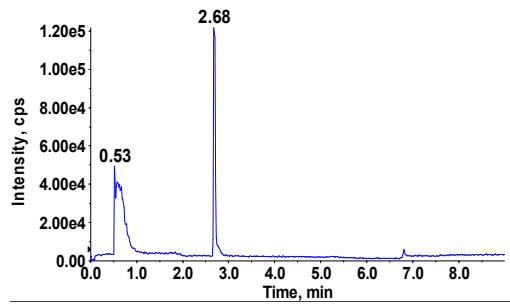
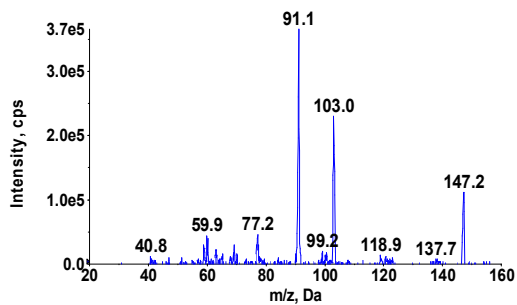


Fenbendazole sulfoxide



11.

Coumarin



7-Hydroxy coumarin

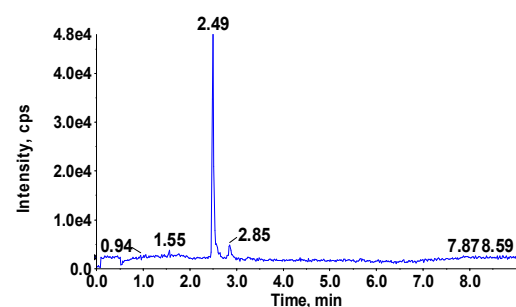
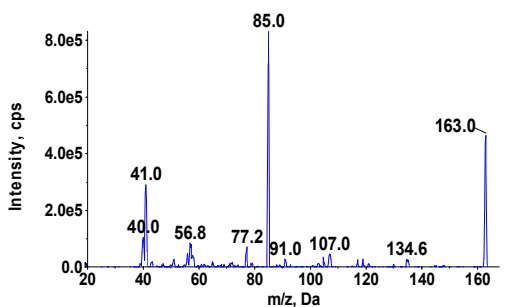
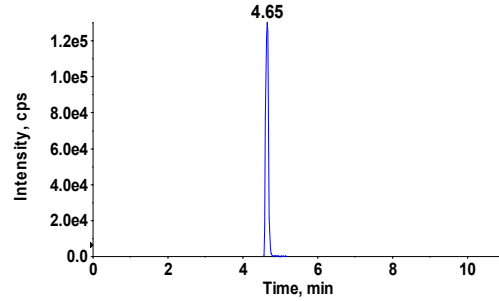
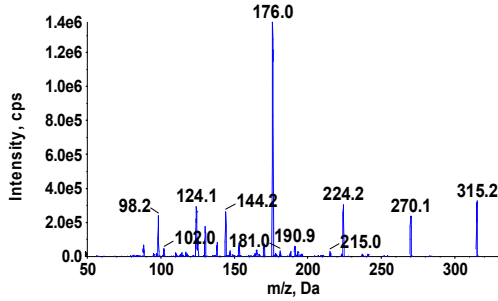


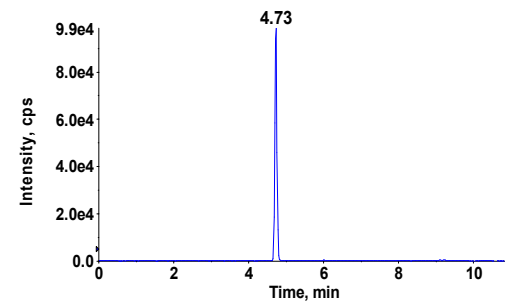
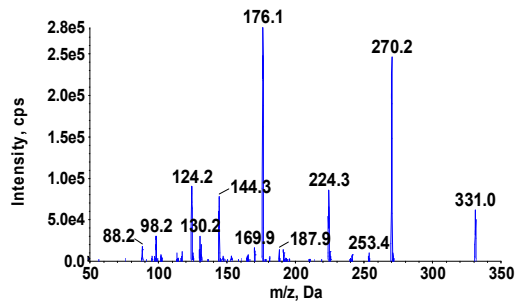
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

12.

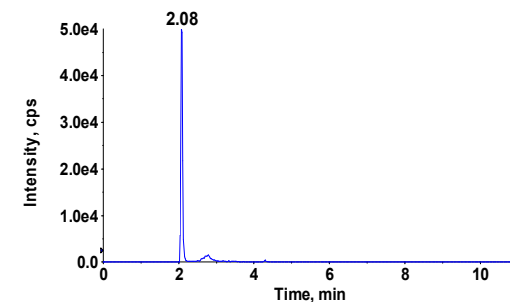
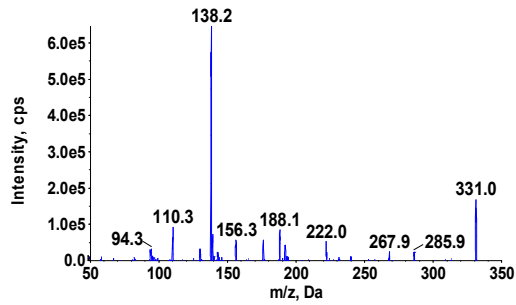
Ranitidine



Ranitidine N-Oxide



Ranitidine S-Oxide



Ranitidine N,S-Dioxide

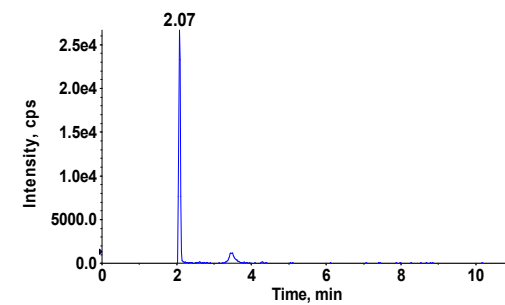
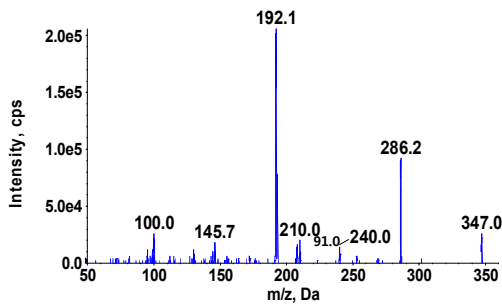
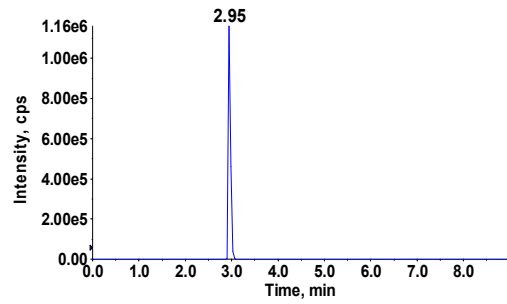
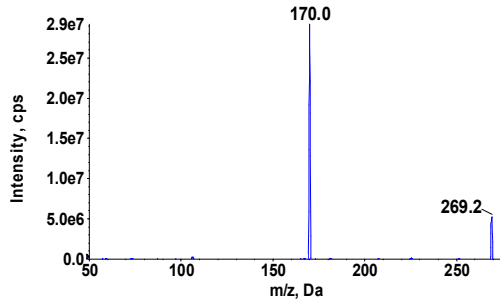


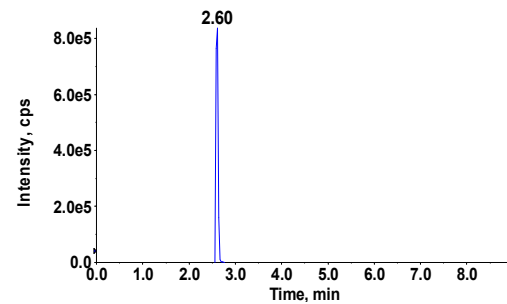
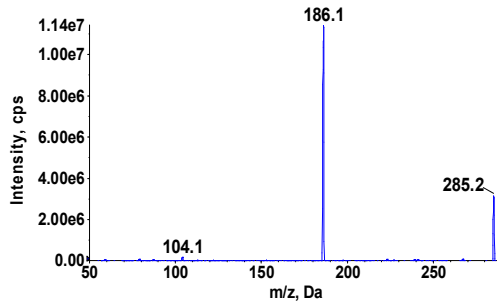
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

13.

Tolbutamide

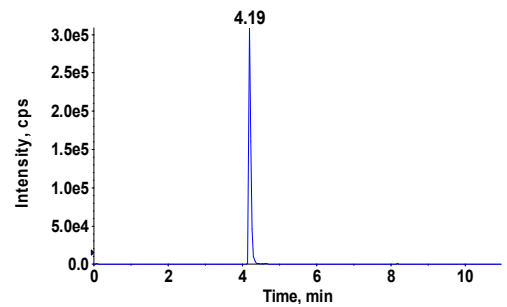
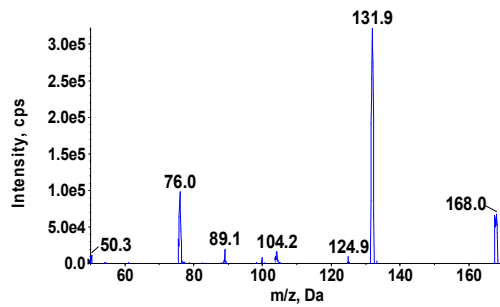


4-Hydroxy tolbutamide



14.

Chlorzoxazone



6-Hydroxy chlorzoxazone

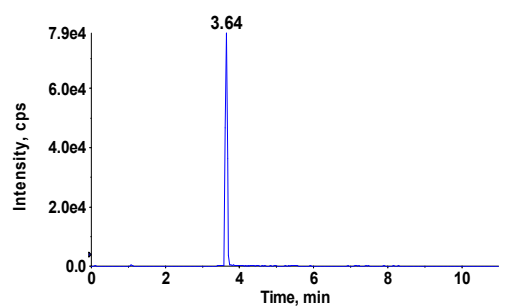
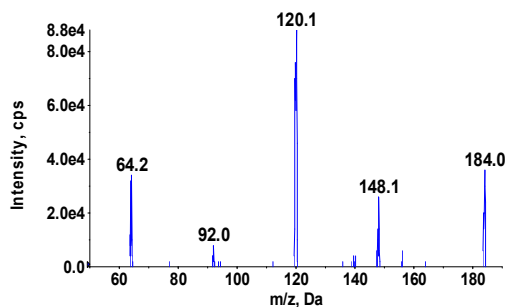
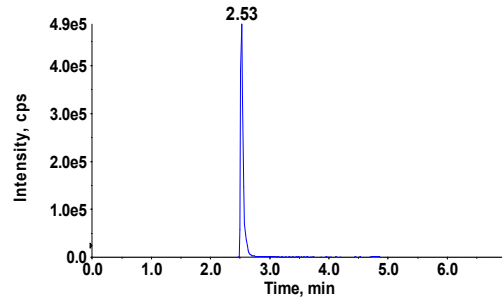
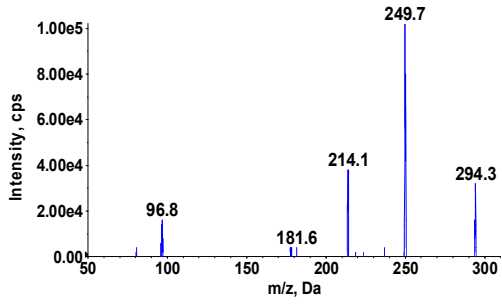


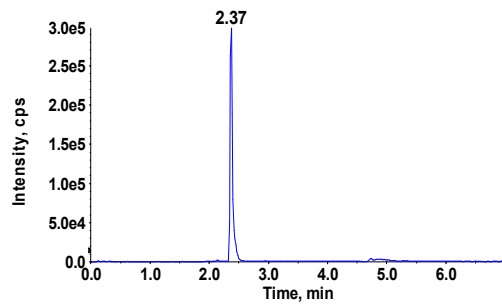
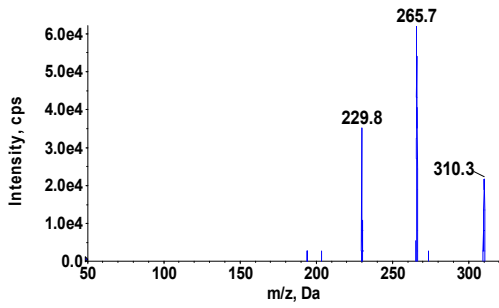
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

15.

Diclofenac



4'-Hydroxy diclofenac



3'-Hydroxy-4'-methoxy diclofenac

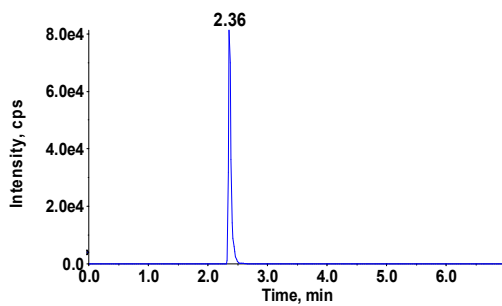
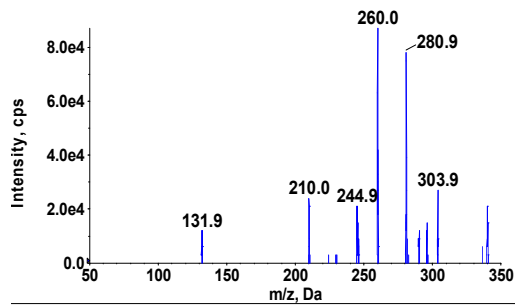
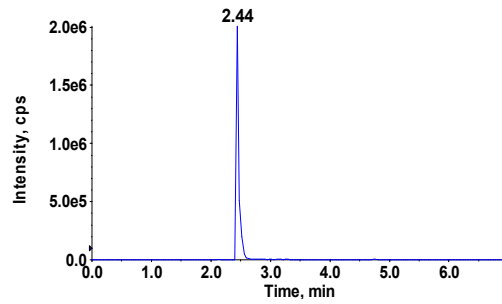
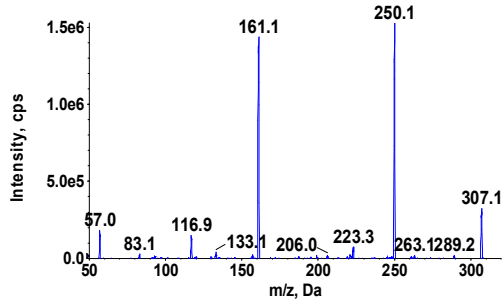


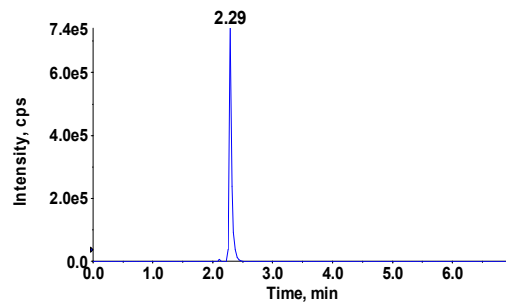
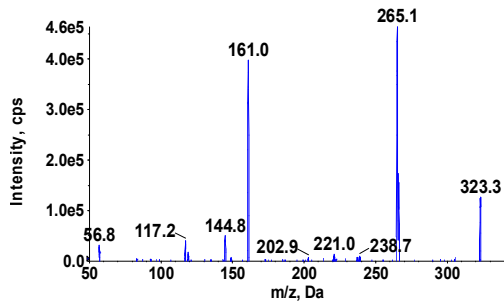
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

16.

Warfarin



4-Hydroxy warfarin



6-Hydroxy warfarin

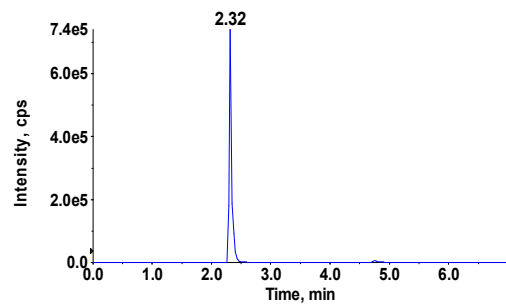
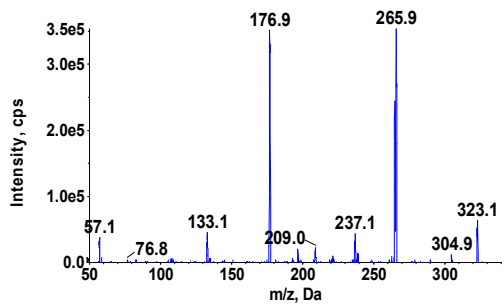
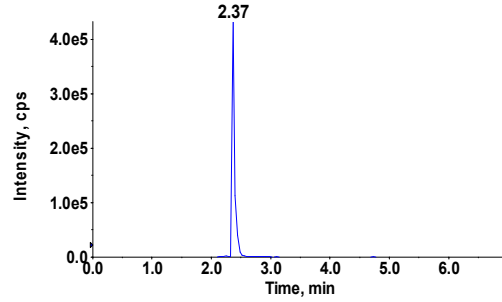
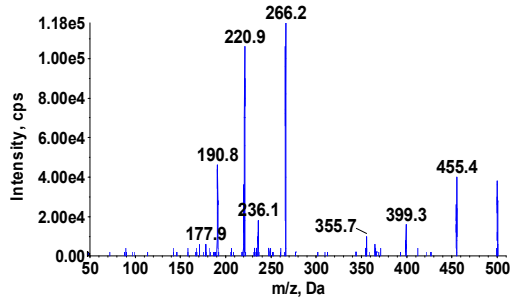


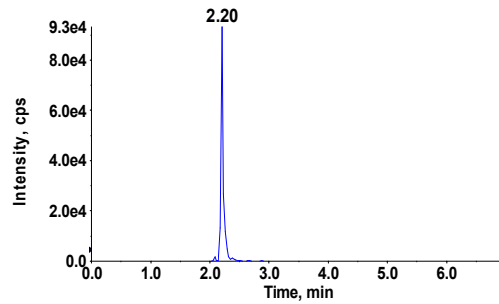
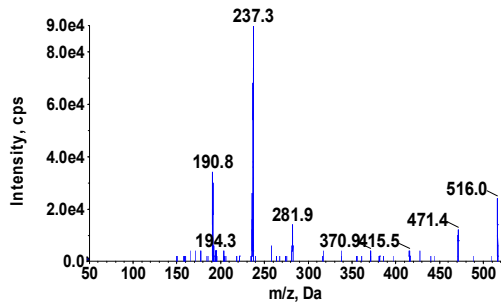
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

17.

Fimasartan



2-Hydroxy butyl fimasartan



BR-A-535

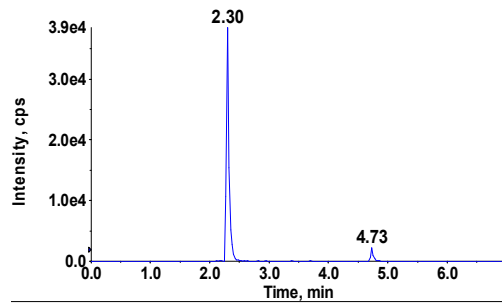
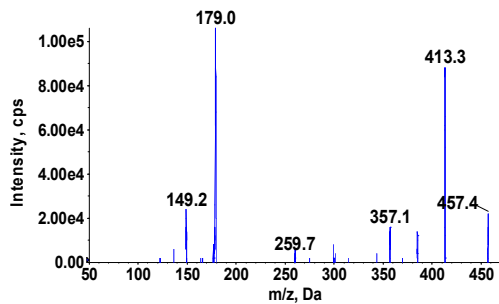
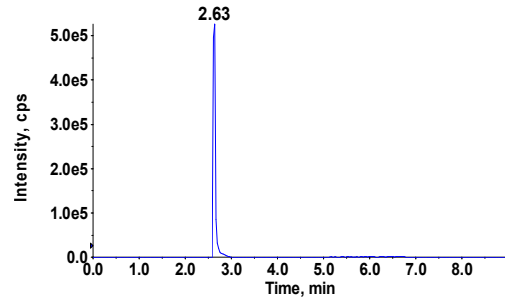
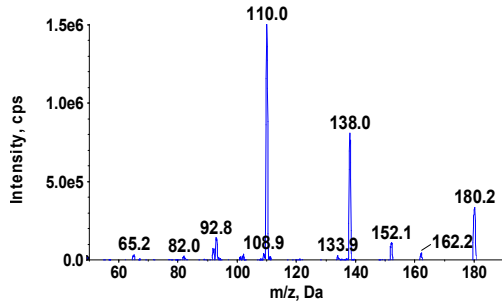


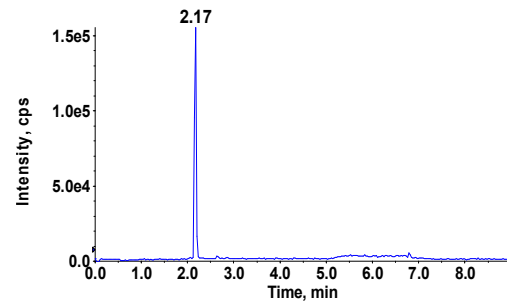
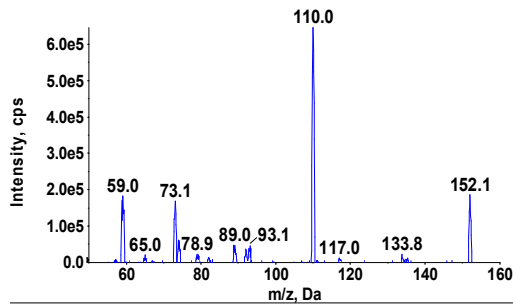
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

18.

Phenacetin

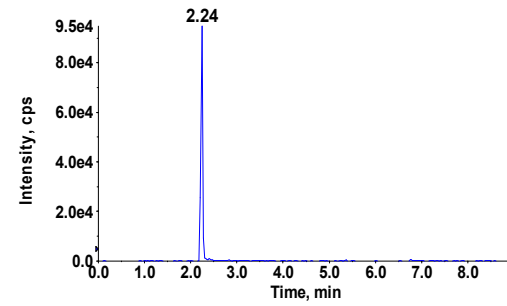
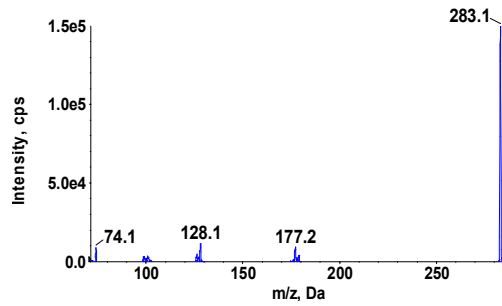


Acetaminophen



19.

Amodiaquine



N-Desethyl amodiaquine

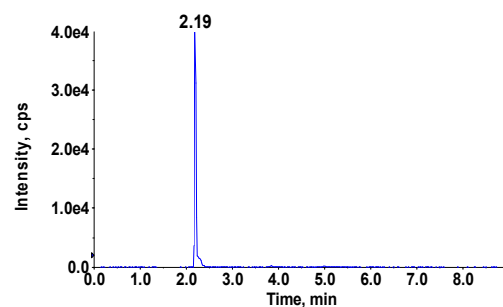
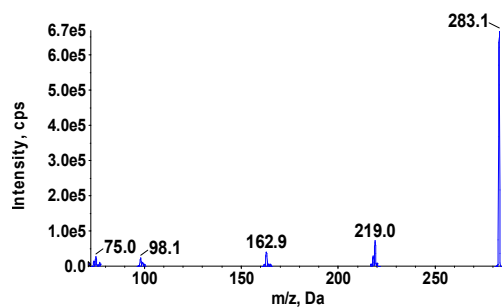
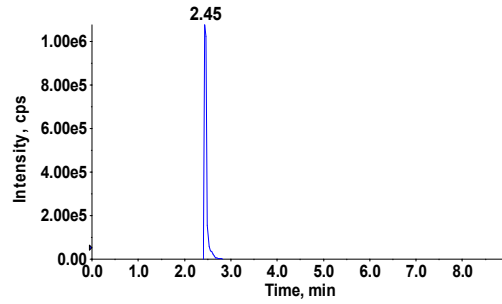
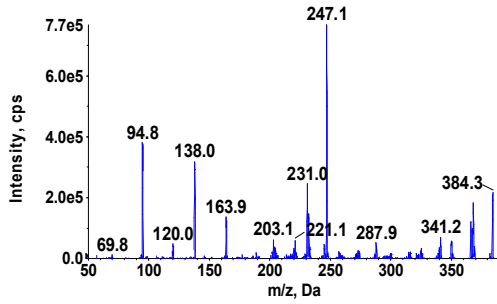


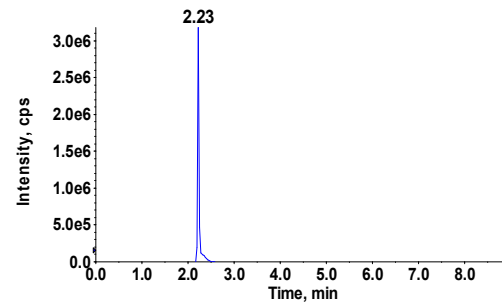
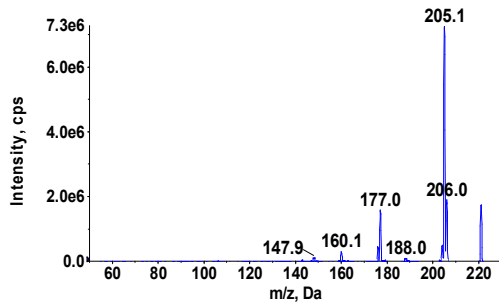
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

20.

Prazosin

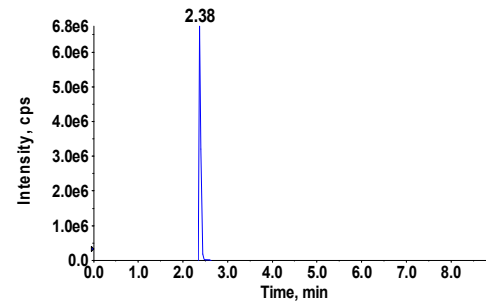
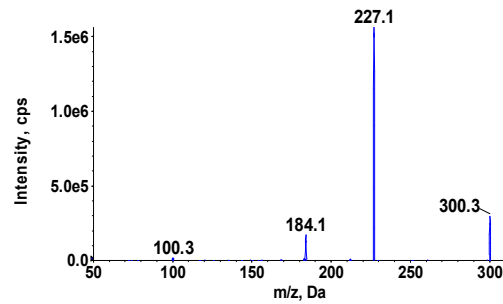


2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline



21.

Metoclopramide



O-Desmethyl metoclopramide

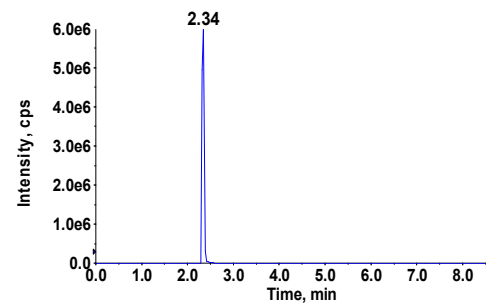
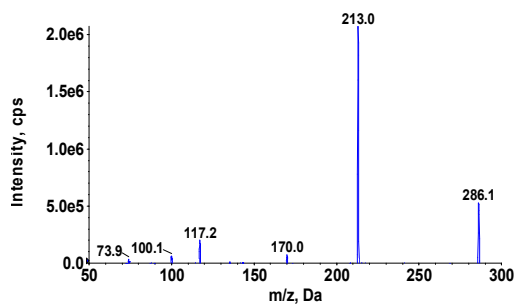
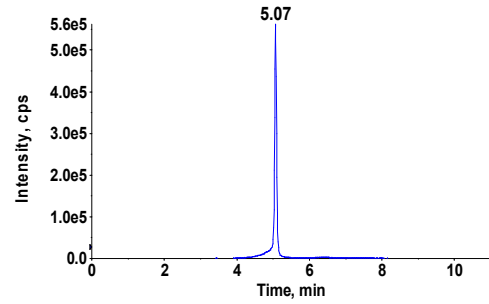
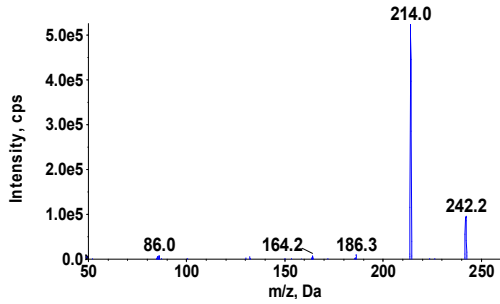


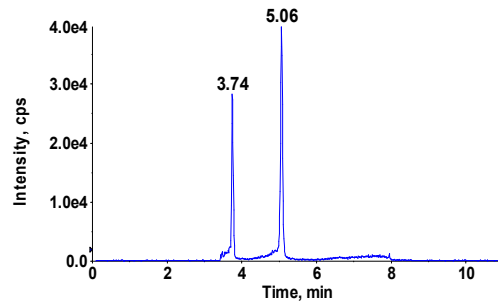
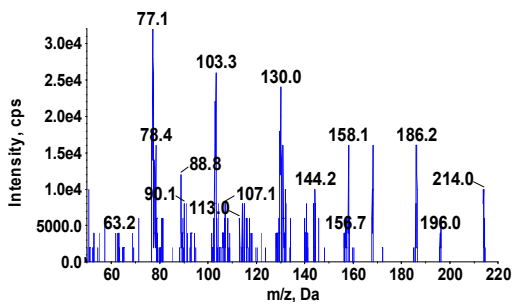
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

22.

7-Ethoxyresorufin

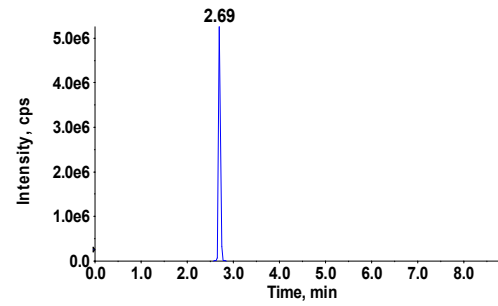
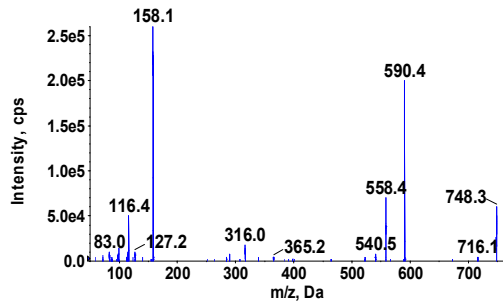


Resorufin



23.

Clarithromycin



N-Desmethyl clarithromycin

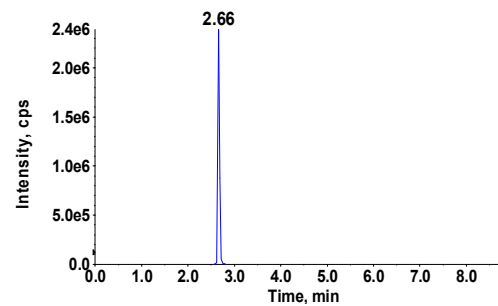
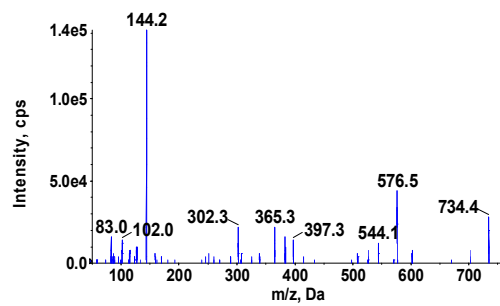
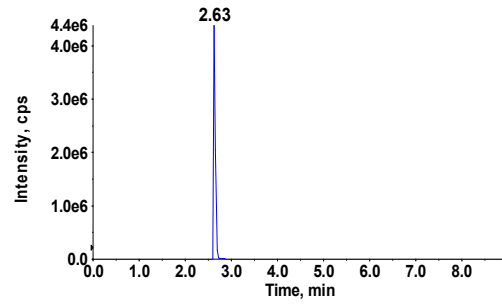
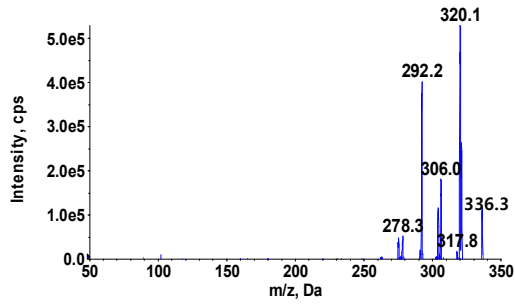


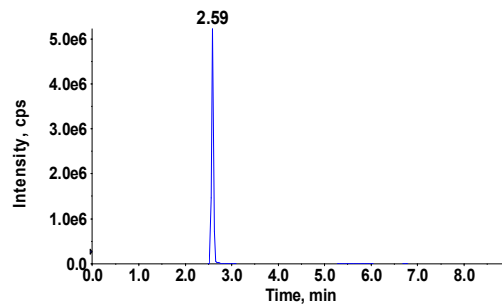
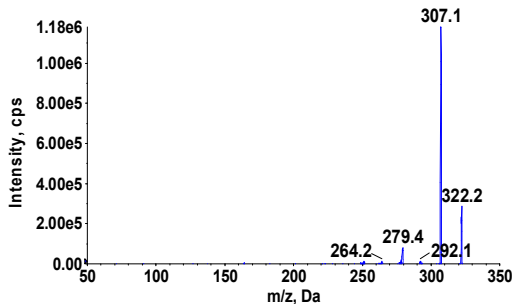
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

24.

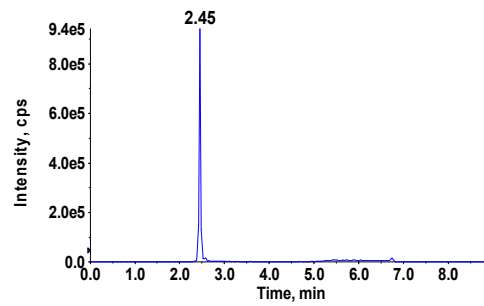
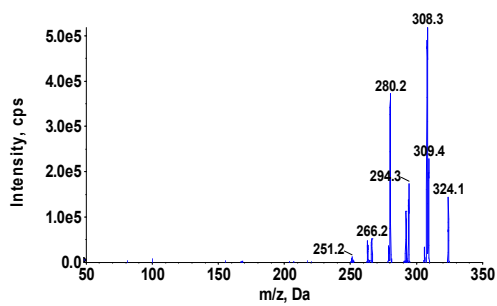
Berberine



Berberrubine



Demethyleneberberine



Jatrorrhizine

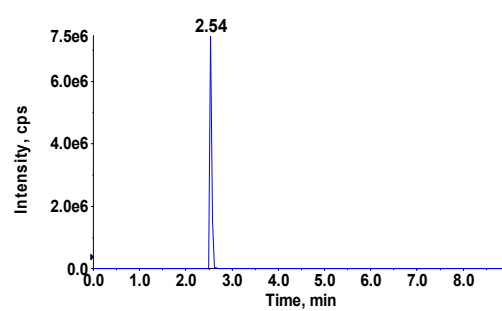
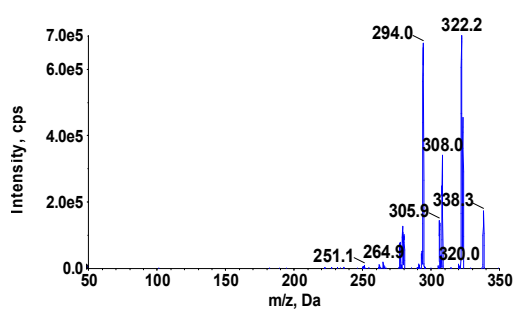
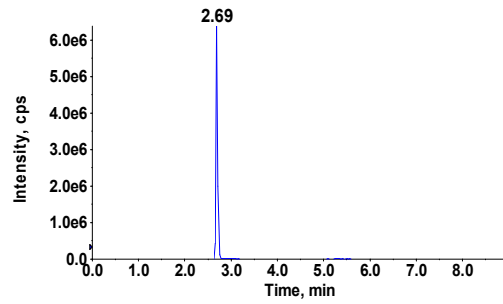
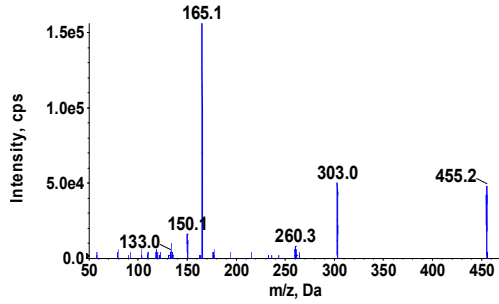


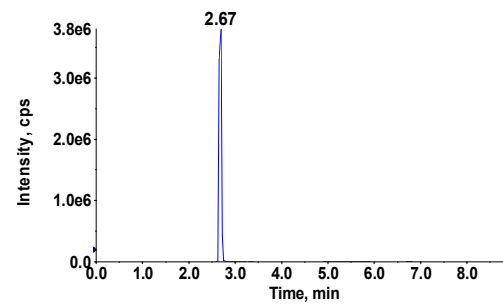
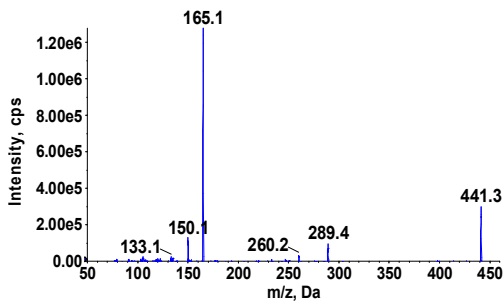
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

25.

Verapamil

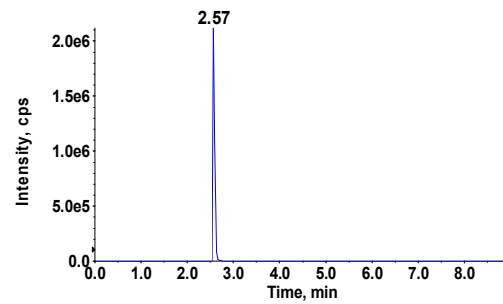
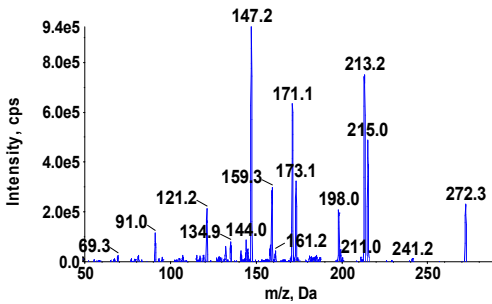


Norverapamil



26.

Dextromethorphan



Dextrorphan

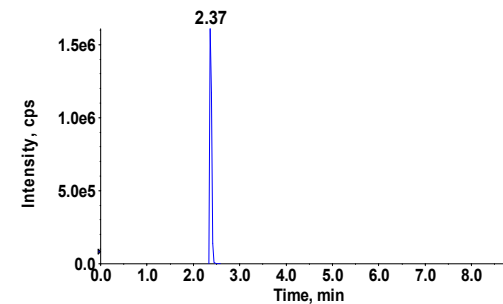
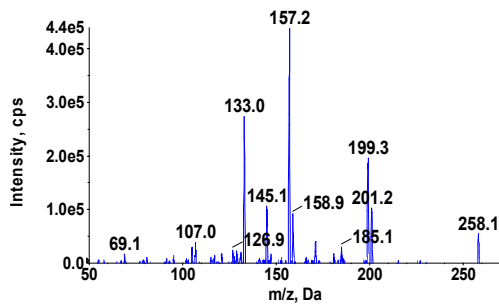
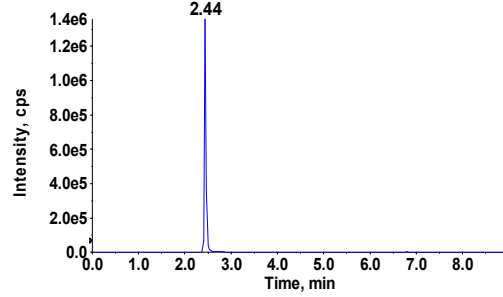
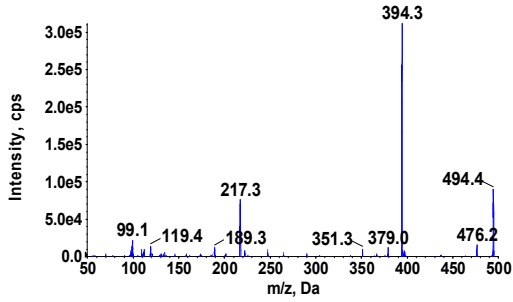


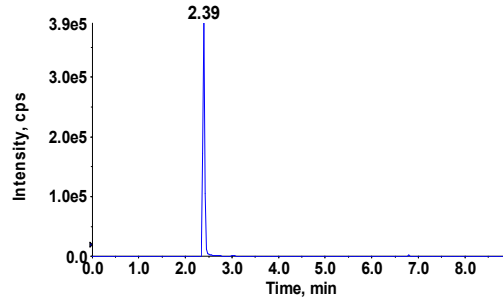
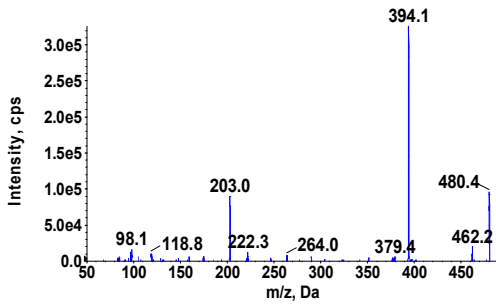
그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

27.

Imatinib

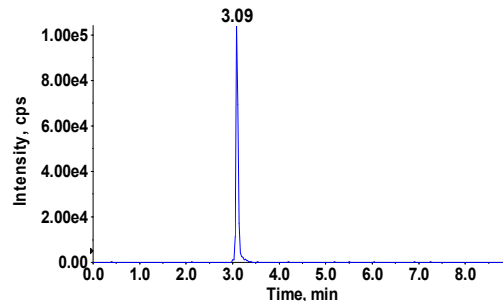
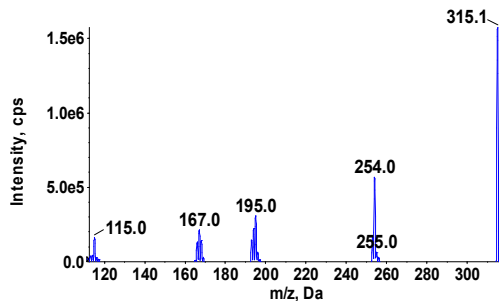


***N*-Desmethyl imatinib**



28.

Nifedipine



Dehydronifedipine

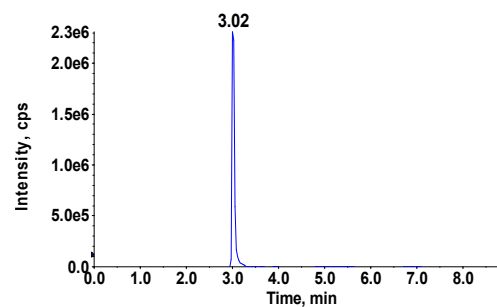
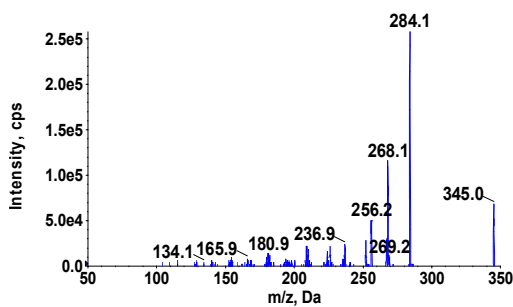


그림 2. 모화합물과 대사체의 MS2 spectrum (좌)과 chromatogram (우) (계속)

표 6. 모화합물과 대사체의 정량분석법 검증

Compound	Range (nM)	Regression (weighting)	x ²	x	y intercept	r	Concentration (nM)		Accuracy (%)	Precision (%CV)
							nominal	measured*		
Bupropion	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	2.04E-01	1.19E-02	1.0000	100	100.2 ± 0.4	100.2	0.4
Hydroxybupropion	0.977 - 1000	Linear (1/x)	-	1.05E-01	2.01E-02	1.0000	100	98.8 ± 0.6	98.8	0.6
Midazolam	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	1.38E-01	-2.29E-03	0.9999	100	102.6 ± 1.5	102.6	1.5
1-Hydroxy midazolam	0.977 - 1000	Linear (1/x)	-	9.24E-02	-2.88E-02	1.0000	100	101.5 ± 0.7	101.5	0.7
Testosterone	3.9 - 1000	Linear (1/x)	-	3.78E-02	-2.65E-03	1.0000	100	99.3 ± 1.9	99.3	2.0
6β-Hydroxy testosterone	62.5 - 1000	Linear (1/x)	-	1.27E-03	-1.16E-02	1.0000	100	100.5 ± 2.1	100.5	2.1
Paclitaxel	3.9 - 1000	Quadratic (1/x)	8.07E-07	6.10E-03	-5.54E-04	0.9999	100	102.8 ± 1.6	102.9	1.6
6α-Hydroxy paclitaxel	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	2.60E-02	2.06E-04	1.0000	100	101.1 ± 1.0	101.1	1.0
Buspirone	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-4.76E-05	2.28E-01	1.42E-03	1.0000	100	105.2 ± 2.2	105.1	2.1
6-Hydroxy buspirone	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-1.72E-04	6.45E-01	4.11E-03	1.0000	100	106.4 ± 1.3	106.4	1.3
Mianserin	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	7.83E-02	3.72E-03	1.0000	100	101.3 ± 1.4	101.3	1.4
8-Hydroxy mianserin	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	8.04E-06	4.89E-02	-4.93E-03	0.9998	100	101.4 ± 0.1	101.4	0.1
Imipramine	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-2.10E-05	4.07E-01	-9.38E-04	1.0000	100	104.4 ± 2.0	104.4	1.8
2-Hydroxy imipramine	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-1.81E-05	2.21E-01	-1.51E-02	1.0000	100	109.4 ± 1.4	109.4	1.3
Lansoprazole	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	8.08E-02	4.23E-04	0.9997	100	104.6 ± 1.0	104.6	1.0
5-Hydroxy lansoprazole	0.977 - 1000	Linear (1/x)	-	3.14E-02	-9.53E-03	0.9998	100	105.2 ± 2.3	105.2	2.2
Lansoprazole sulfone <i>N</i> -Oxide	0.977 - 1000	Linear (1/x)	-	9.63E-02	-9.07E-03	1.0000	100	99.6 ± 1.4	99.6	1.5
Lansoprazole sulfide	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-4.12E-05	2.28E-01	-2.83E-03	1.0000	100	94.4 ± 7.3	94.4	7.8

*mean±SD

표 6. 모화합물과 대사체의 정량분석법 검증 (계속)

Compound	Range (nM)	Regression (weighting)	x ²	x	y intercept	r	Concentration (nM)		Accuracy (%)	Precision (%CV)
							nominal	measured*		
Tamoxifen	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	2.04E-01	2.69E-02	1.0000	100	98.2 ± 3.4	98.2	3.5
4-Hydroxy tamoxifen	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	1.85E-01	8.85E-03	1.0000	100	100.5 ± 2.3	100.5	2.3
Fenbendazole	0.244-1000	Linear (1/x)	-	2.29E-01	7.04E-03	1.0000	100	92.2 ± 0.2	92.2	0.2
Fenbendazole sulfoxide	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	4.22E-02	6.42E-04	1.0000	100	92.3 ± 0.7	92.3	0.8
Ranitidine	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	1.52E-01	4.72E-03	1.0000	100	97.0 ± 2.1	97.0	2.2
Ranitidine <i>N</i> -Oxide	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-1.03E-05	9.22E-02	5.97E-04	1.0000	100	97.8 ± 3.3	97.8	3.4
Ranitidine <i>S</i> -Oxide	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-8.65E-06	3.55E-02	1.09E-02	1.0000	100	99.9 ± 2.4	99.9	2.4
Ranitidine <i>N,S</i> -Dioxide	0.977 - 1000	Quadratic (1/x)	-2.89E-06	1.74E-02	8.63E-03	0.9999	100	101.5 ± 2.2	101.5	2.2
Coumarin	62.5 - 1000	Linear (1/x)	-	7.94E-03	1.55E-01	1.0000	100	100.6 ± 0.4	100.6	0.4
7-Hydroxy coumarin	62.5 - 1000	Linear (1/x)	-	2.83E-03	1.43E-01	1.0000	100	101.1 ± 0.6	101.1	0.6
Tolbutamide	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	6.94E-03	9.68E-03	0.9998	100	102.9 ± 0.6	102.9	0.6
4-Hydroxy tolbutamide	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	5.94E-02	4.81E-03	0.9999	100	103.9 ± 1.0	103.9	1.0
Chlorzoxazone	3.9 - 1000	Linear (1/x)	-	2.09E-03	2.86E-02	1.0000	100	101.3 ± 2.1	101.3	2.0
6-hydroxy chlorzoxazone	0.977 - 1000	Quadratic (1/x)	2.36E-06	3.94E-03	2.27E-03	0.9999	100	102.2 ± 0.9	102.2	0.9
Diclofenac	15.6 - 1000	Linear (1/x)	-	2.92E-02	2.87E-01	1.0000	100	98.9 ± 1.6	98.9	1.6
4'-Hydroxy diclofenac	3.9 - 1000	Quadratic (1/x)	1.84E-06	1.60E-02	2.80E-02	1.0000	100	102.9 ± 2.2	102.9	2.2
3'-Hydroxy-4'-methoxy diclofenac	62.5 - 1000	Quadratic (1/x)	9.04E-07	3.92E-03	-1.73E-01	1.0000	100	102.6 ± 4.4	102.6	4.4
Warfarin	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-1.04E-05	1.30E-01	2.03E-03	1.0000	100	104.9 ± 2.1	104.9	2.0
4-Hydroxy warfarin	0.977 - 1000	Quadratic (1/x)	-6.30E-06	5.44E-03	7.05E-03	1.0000	100	102.5 ± 1.1	102.5	1.0
6-Hydroxy warfarin	0.977 - 1000	Quadratic (1/x)	-3.79E-06	6.05E-03	-9.82E-03	1.0000	100	100.9 ± 2.0	100.9	2.0

*mean±SD

표 6. 모화합물과 대사체의 정량분석법 검증 (계속)

Compound	Range (nM)	Regression (weighting)	x ²	x	y intercept	r	Concentration (nM)		Accuracy (%)	Precision (%CV)
							nominal	measured*		
Fimasartan	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	3.03E-02	5.56E-03	1.0000	100	98.3 ± 2.7	98.3	2.7
2-Hydroxy butyl fimasartan	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	7.73E-03	7.41E-04	1.0000	100	97.5 ± 1.6	97.5	1.7
BR-A-535	0.977 - 1000	Linear (1/x)	-	2.26E-02	-2.80E-03	1.0000	100	98.5 ± 1.8	98.5	1.8
Phenacetin	0.977 - 1000	Linear (1/x)	-	7.79E-02	3.72E-02	1.0000	100	101.2 ± 0.9	101.2	0.9
Acetaminophen	15.6 - 1000	Linear (1/x)	-	1.42E-02	-5.88E-03	1.0000	100	100.5 ± 0.4	100.5	0.4
Amodiaquine	0.977 - 1000	Linear (1/x)	-	1.57E-02	-3.50E-03	0.9999	100	102.6 ± 2.6	102.6	2.5
<i>N</i> -Desethyl amodiaquine	0.977 - 1000	Quadratic (1/x)	-6.37E-06	2.79E-02	-1.11E-02	1.0000	100	98.9 ± 4.2	98.9	4.2
Prazosin	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	8.52E-06	1.28E-01	3.34E-03	0.9999	100	109.6 ± 2.1	109.6	1.9
2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	1.73E-05	2.25E-01	1.51E-02	1.0000	100	108.2 ± 4.7	108.2	4.4
Metoclopramide	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	4.77E-01	-5.18E-02	0.9999	100	98.3 ± 1.0	98.3	1.0
<i>O</i> -Desmethyl metoclopramide	0.977 - 1000	Linear (1/x)	-	1.85E-02	-8.27E-03	0.9999	100	98.2 ± 1.8	98.2	1.8
7-Ethoxyresorufin	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	4.77E-01	-5.18E-02	0.9999	100	99.6 ± 2.2	99.6	2.2
Resorufin	0.977 - 1000	Linear (1/x)	-	1.85E-02	-8.27E-03	0.9999	100	101.4 ± 1.9	101.4	1.9
Berberine	0.244 - 250	Linear (1/x)	-	6.36E-01	1.14E-02	1.0000	100	98.5 ± 1.0	98.5	1.0
Berberrubine	3.9 - 250	Quadratic (1/x)	1.01E-03	3.78E-01	-1.54E+00	0.9998	100	97.0 ± 2.2	97.0	2.2
Demethyleneberberine	62.5 - 250	Linear (1/x)	-	1.37E-01	-7.93E+00	0.9999	100	97.4 ± 2.1	97.4	2.2
Jatrorrhizine	0.244 - 250	Linear (1/x)	-	6.77E-01	1.64E-02	1.0000	100	99.3 ± 1.2	99.3	1.2
Clarithromycin	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-2.47E-04	5.22E-01	1.01E-02	1.0000	100	103.6 ± 1.8	103.6	1.7
<i>N</i> -Desmethyl clarithromycin	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-1.24E-04	2.25E-01	4.56E-03	1.0000	100	104.1 ± 1.4	104.1	1.3

*mean±SD

표 6. 모화합물과 대사체의 정량분석법 검증 (계속)

Compound	Range (nM)	Regression (weighting)	x ²	x	y intercept	r	Concentration (nM)		Accuracy (%)	Precision (%CV)
							nominal	measured*		
Verapamil	0.244 - 250	Linear (1/x)	-	4.91E-01	1.76E-02	1.0000	100	105.4 ± 1.3	105.4	1.3
Norverapamil	0.244 - 250	Linear (1/x)	-	3.96E-01	1.71E-02	0.9999	100	103.6 ± 1.2	103.6	1.1
Dextromethorphan	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	4.8352E-06	1.70E-01	-8.58E-03	1.0000	100	103.1 ± 1.5	103.1	1.5
Dextrorphan	0.244 - 1000	Linear (1/x)	-	1.65E-01	-1.18E-02	1.0000	100	103.5 ± 1.4	103.5	1.4
imatinib	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-1.0172E-05	1.73E-01	-3.39E-03	1.0000	100	104.1 ± 2.3	104.1	2.2
N-Desmethyl imatinib	0.244 - 1000	Quadratic (1/x)	-2.2230E-06	5.54E-02	-1.95E-03	1.0000	100	103.2 ± 1.1	103.2	1.1
Nifedipine	0.977 - 1000	Quadratic (1/x)	6.923E-06	3.61E-02	-1.87E-02	1.0000	100	104.7 ± 2.2	104.7	2.1
Dehydronifedipine	3.9 - 1000	Quadratic (1/x)	2.808E-05	3.29E-01	3.77E-01	1.0000	100	96.4 ± 3.9	96.4	4.1

*mean±SD

3. Phase I reaction (일상 대사 반응)에 의한 대사체의 semi-quantification 검증

3.1 Response factor (RF)

대사체의 표준품 부재 시 이를 정량하기 위해 대사체를 모화합물 정량분석조건과 대사체 정량분석조건으로 분석하였을 때 ESI 반응을 비교하였다. 각각의 분석조건에 따른 이온화 정도를 area ratio로 얻어 이 비율을 RF식으로 계산하였다 (재료 및 방법 3번 참고). RF값이 1이면 semi-quantification이 잘 부합되는 것을 의미한다. 대사체의 RF값은 그림 3에 정리하였다. Semi-quantification 가 가능한 범위를 생물학적 분석법 밸리데이션 가이드라인의 오차한계 ($\pm 15\%$)와 약물탐색단계에서 주로 사용하는 오차한계인 $\pm 30\%$ 을 기준으로 확인하였다.^{43, 50} 37개 대사체 중 26개는 $\pm 15\%$ 오차한계에 들어왔고, 30개의 대사체는 $\pm 30\%$ 오차범위 내로 관찰하였다. Phase I 반응으로 생성된 대사체의 81%는 semi-quantification이 가능하다는 것을 확인하였다. 반면, 37개 대사체 중 7개의 대사체 (1-hydroxymidazolam, lansoprazole sulfone *N*-oxide, ranitidine *N*-oxide, BR-A-535, resorufin, lansoprazole sulfide, dehydronifedipine)는 오차범위를 벗어났다. 오차범위에 벗어난 대사체의 이온화 정도는 최소 1.6배 (Resorufin)에서 최대 53배 (Lansoprazole sulfide) 차이로 관찰되었다.

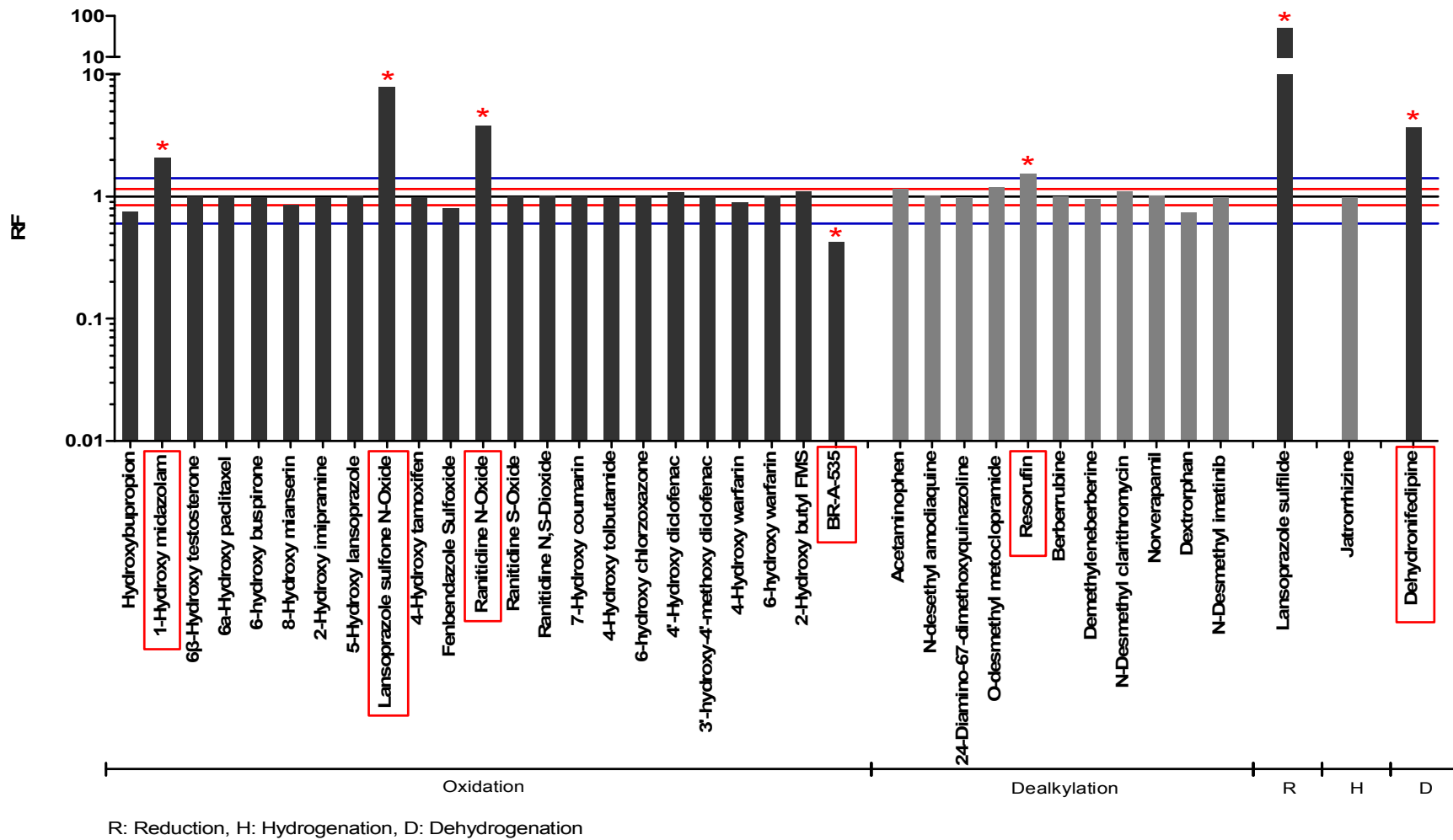


그림 3. 대사체 RF의 값. 빨간선 (오차범위 ±15%), 파란선 (오차범위 ±30%), 별표 (오차범위 ±30% 벗어난 대사체).

3.2. 물리화학적 특성에 따른 검증

결과부분 3.1 (RF)에서 언급한 오차범위를 벗어나는 물질은 모화합물과 대사체의 물리화학적 특징들을 비교하여 구조 변화에 따른 이온화 정도를 비교하였다. 16 가지의 물리화학적 특성 (pKa, logP, polar surface area, molecular volume 등)을 비교하여 그 원인을 파악하였다. 그 중 pKa 에서 유의미한 결과를 확인하였다. pKa 와 RF 값과의 상관성은 그림 4에서 보여준다. 대체적으로 pKa 차이가 1 이상이면 $\pm 30\%$ 의 오차범위를 벗어나는 것을 확인하였다. 예외적으로 ranitidine *N,S*-dioxide, 6-hydroxy chlorzoxazone, *N*-desmethyl imatinib 은 pKa 차이가 1 이상였지만 RF 값은 1 에 가까웠다. Semi-quantification 분석 시 모화합물과 대사체의 pKa 값을 확인하고 이 값의 차이가 1 이상 발생하는 경우 주의를 요하여 분석을 진행해야 할 것으로 사료된다.

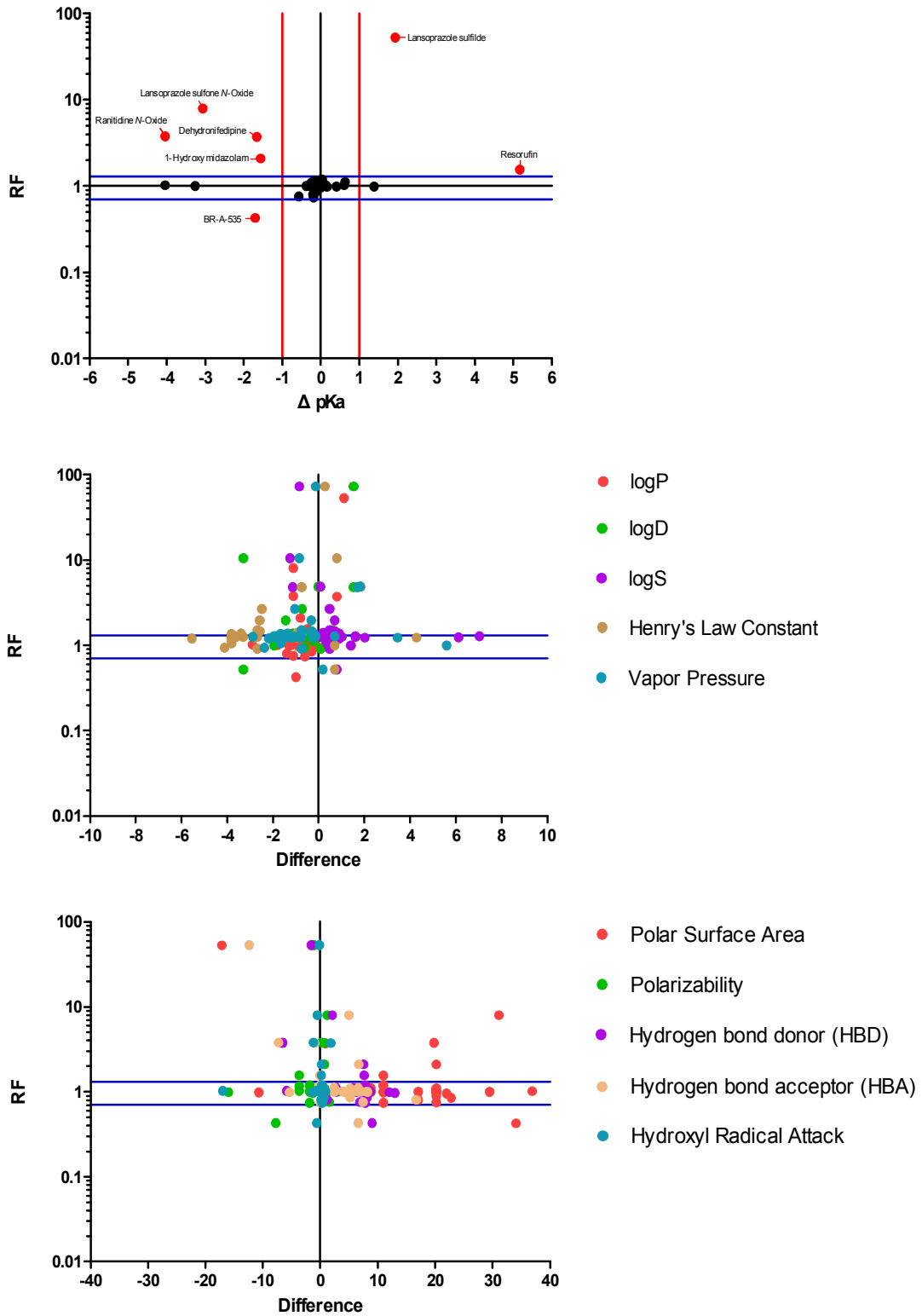


그림 4. RF 값과 물리화학적 특성과의 상관관계. 파란선 (오차 범위 $\pm 30\%$)

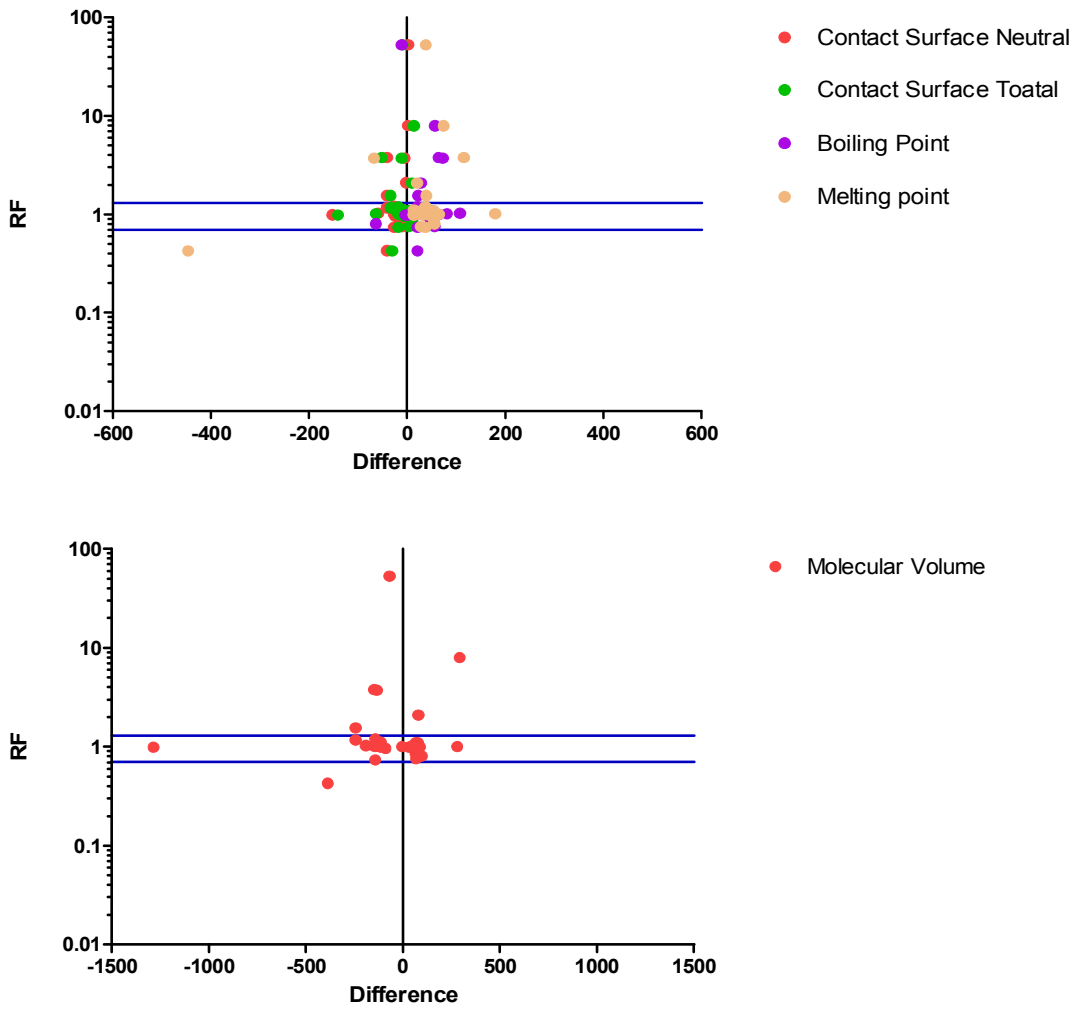


그림 4. RF 값과 물리화학적 특성과의 상관관계. 파란선 (오차 범위 $\pm 30\%$) (계속)

3.3. 구조적 특성에 따른 검증

3.3.1 Chloride (Cl)

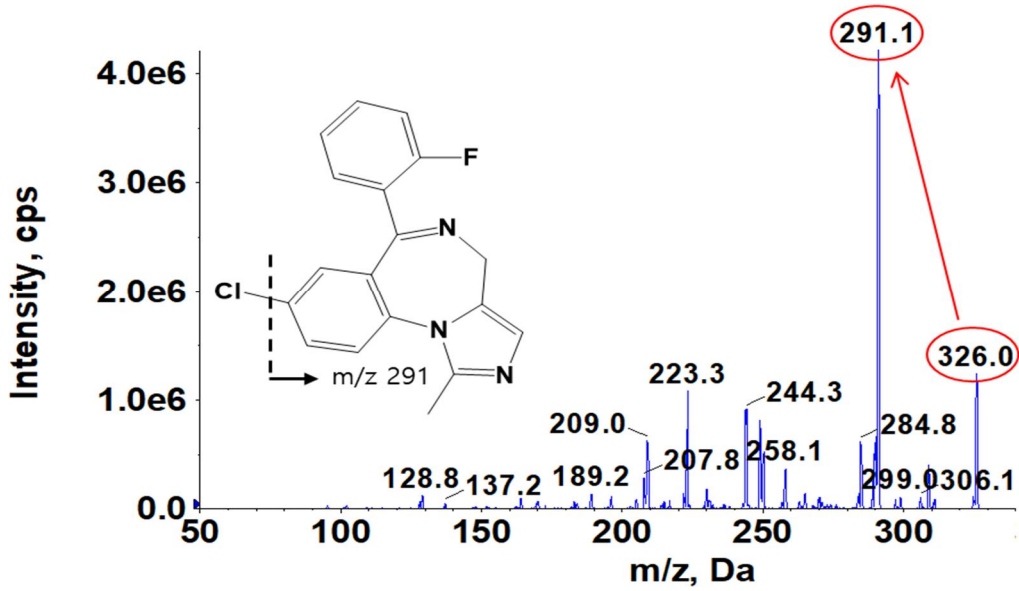
오차범위를 벗어나는 물질의 구조를 확인해보니 구조 내의 이온화에 영향을 주는 할로겐 원소 (Cl)을 포함하고 있었고 이에 따라 모화합물과 대사체의 구조에 할로겐 원소 (Cl)가 포함된 형태에서 RF와의 상관성을 확인하였다. 모화합물과 대사체의 조각 구조 내 Cl 유무에 따른 RF값의 상관성이 있음을 확인하였다 (표7). 모화합물과 대사체의 조각 구조 내 모두 Cl이 존재하거나 둘다 존재하지 않은 경우 RF 값 오차 범위 ($\pm 30\%$) 내인 반면, midazolam과 1-hydroxy midazolam의 경우 (그림 5), 조각 구조 내 둘 중 한 곳에만 Cl이 존재하는 경우로 RF 값이 2.09로 오차 범위를 벗어났다. ESI 반응에 영향을 미치는 할로겐 원소 (Cl, Br, F)를⁴⁵ 포함하는 모화합물과 대사체를 semi-quantification 분석 시 구조의 조각 이온에 할로겐 원소의 유무에 따라 RF와의 상관성을 확인해야 한다.

표 7. 모화합물과 대사체의 조각 구조 내 chloride (Cl) 유무에 따른 RF 값

Biotransformation	Parent compound	Metabolite	Presence of Cl in the fragment		RF
			Parent compound	Metabolite	
Oxidation	Bupropion	Hydroxybupropion	O	O	0.75
	Midazolam	1-Hydroxy midazolam	X	O	2.09
	Chlorzoxazone	6-Hydroxy chlorzoxazone	X	X	1.00
	Diclofenac	4'-Hydroxy diclofenac	O	O	1.09
		3'-Hydroxy-4'-methoxy diclofenac	O	O	1.00
Dealkylation	Amodiaquine	<i>N</i> -Desethyl amodiaquine	X	X	1.03
	Metoclopramide	<i>O</i> -Desmethyl metoclopramide	O	O	1.25

A.

Midazolam



B.

1-Hydroxy midazolam

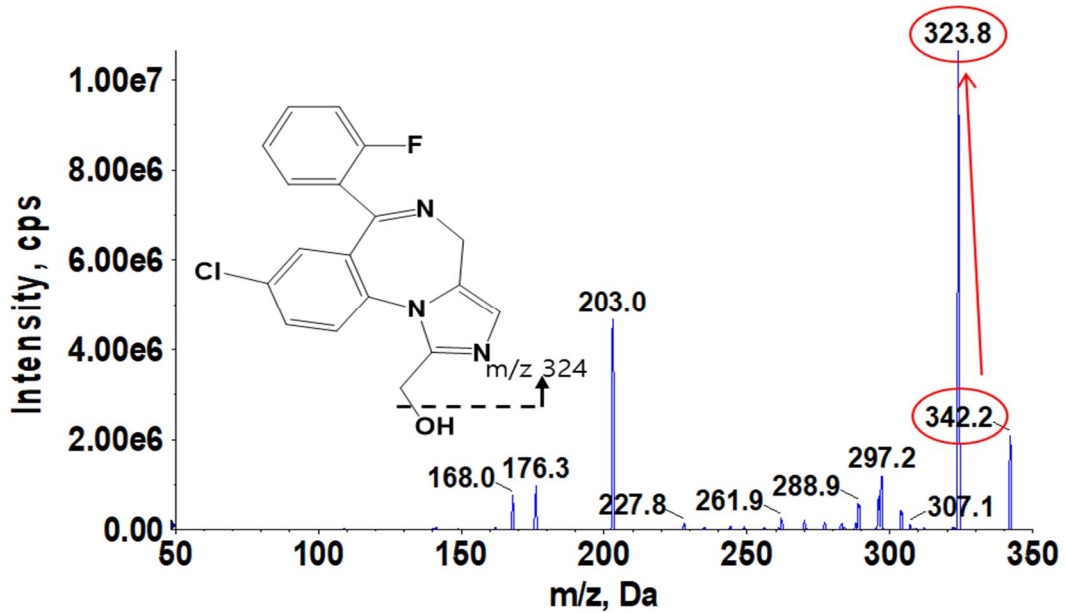


그림 5. Midazolam (A)과 대사체 (B)의 구조 및 MS/MS spectrum

3.3.2 Sulfur (S)

화합물의 구조 내에 S가 존재 시, RF 값의 상관성을 확인하였다. 그림 6은 oxidative desulfurization, sulfoxide reduction에 의한 구조 변화에 따라 RF 값이 $\pm 30\%$ 오차 범위가 벗어났으며, 모화합물과 대사체의 pKa 차이도 1 이상이었다. 특히 sulfoxide reduction 반응이 발생 시 이온화 정도 차이가 52.8배이었다. 반면, fenbendazole sulfoxide, ranitidine S-oxide와 같이 sulfoxide 반응에 의해서는 $RF \approx 1$ 와 $pKa \approx 1$ 이었다.

3.3.3 Nitrogen (N)

N-oxide 를 형성하는 대사체에서도 RF 값과 연관성이 있었다. 그림 7 을 보면 lansoprazole sulfone N-oxide, ranitidine N-oxide 과 같이 대사과정 중 N-oxide 가 생성될 경우 이온화 정도 차이가 3~7 배 이상이었으며, 이 경우에 pKa 차이도 1 이상이었다. 예외적으로 ranitidine N,S-dioxide 는 pKa 차이가 1 이상이었지만 RF 값은 1 이었다.

3.3.4 Dehydrogenation

Dehydrogenation의 경우 mass 값은 2 밖에 차이가 나지 않지만 pKa 값이 1이상 발생할 경우 RF 역시 차이가 났다 (그림8). 이는 1개 물질로 확인한 결과임으로 향후 다양한 물질을 선정하여 이를 증명해야 한다.

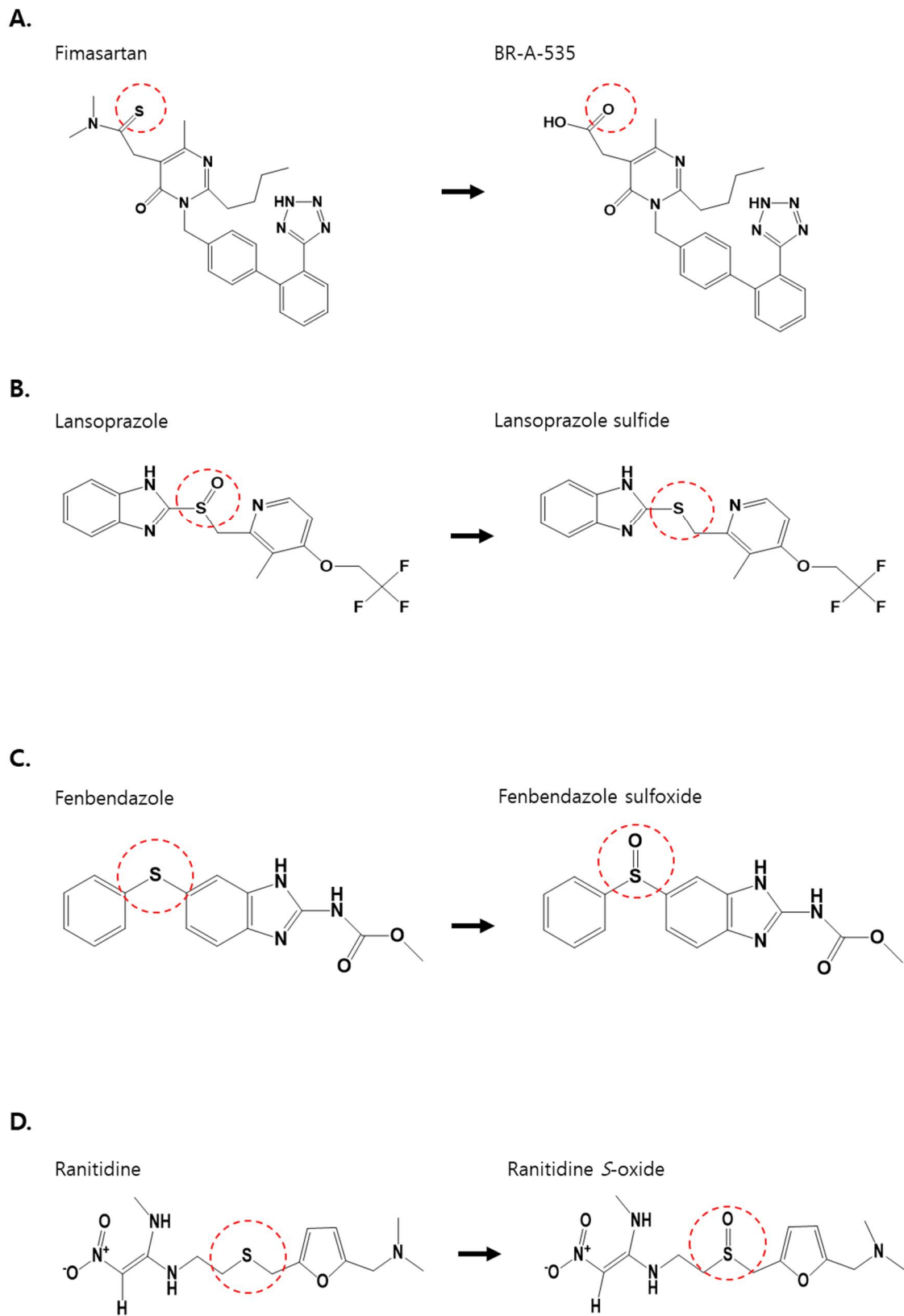
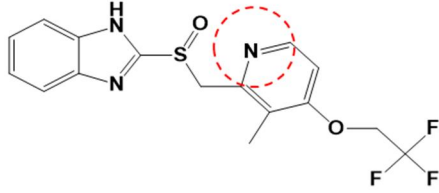


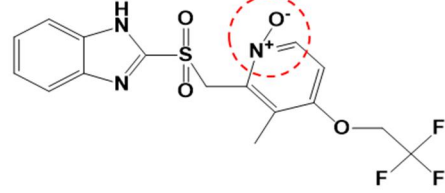
그림 6. 구조에 sulfur (S) 포함된 화합물 및 대사체

A.

Lansoprazole

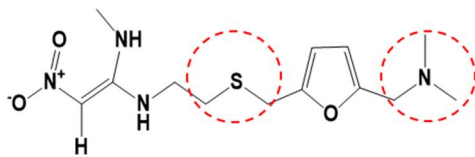


Lansoprazole sulfone *N*-oxide

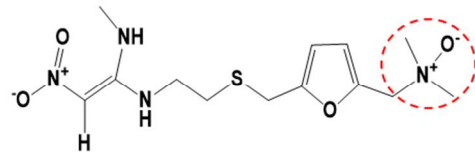


B.

Ranitidine



Ranitidine *N*-oxide



Ranitidine *N,S*-dioxide

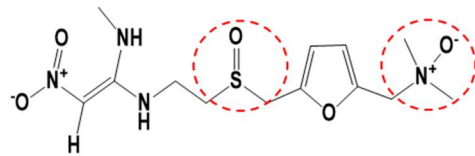
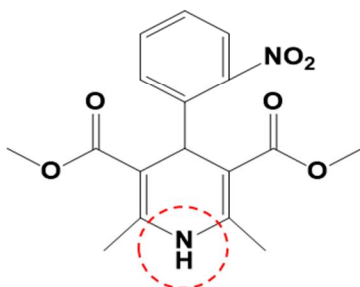


그림 7. *N*-oxide와 *N,S*-oxide 생성하는 화합물 및 대사체

A.

Nifedipine



Dehydronifedipine

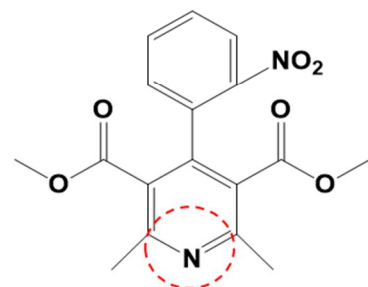


그림 8. Dehydrogenation 반응하는 화합물과 대사체

3.4. MS 파라미터

모화합물과 대사체의 물리화학적 및 구조적 특성 이외에도 MS 파라미터에 따른 RF와의 상관성을 확인하였다. MS 파라미터 DP, EP, CE, CXP 중에서 특히 CE에서 유의미한 결과를 확인하였다 (그림9). 전반적으로 모화합물과 대사체의 CE 값의 차이가 5이상인 경우, RF 값이 $\pm 30\%$ 오차 범위를 벗어남을 확인하였다. pKa 차이가 1 이상(resorufin)일 경우 ΔCE 은 6이었다. 조각 구조 내의 CI 유무의 차이 (1-hydroxy midazolam)가 있을 시 ΔCE 은 10이었다. N-oxide 생성될 경우 ΔCE 가 6 (ranitidine N-Oxide) 또는 12 (lansoprazole sulfone N-oxide)이었다. Sulfur (S)의 구조 변화 있을 경우는 ΔCE 가 18 (lansoprazole sulfide) 또는 20(BR-A-535)이었다. Dehydronifedipine (dehydrogenation에 의한 구조 변화)은 ΔCE 가 10이었다.

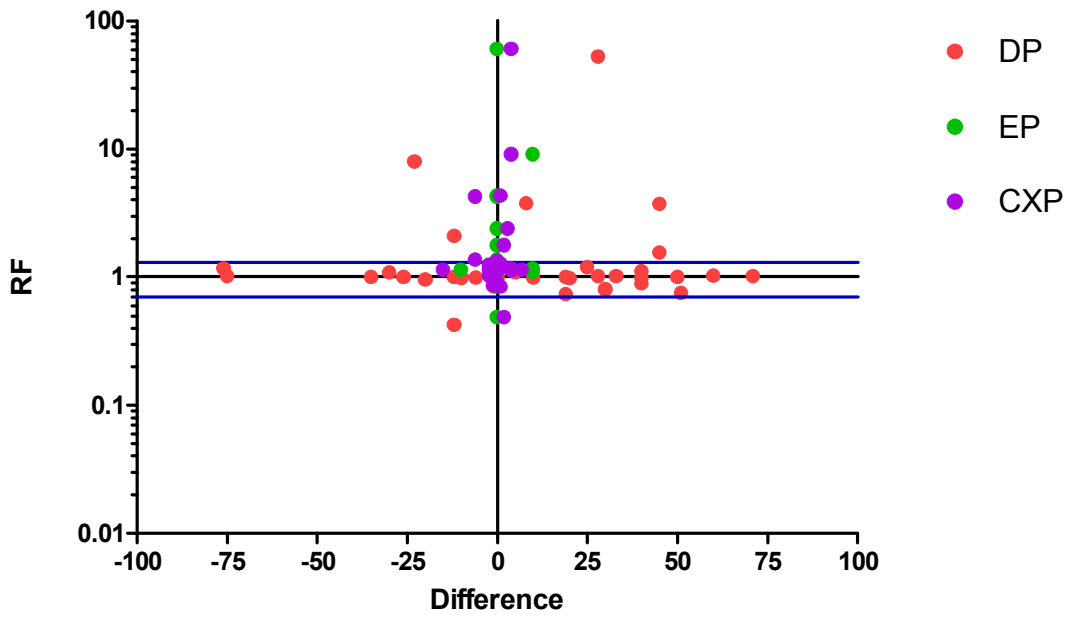
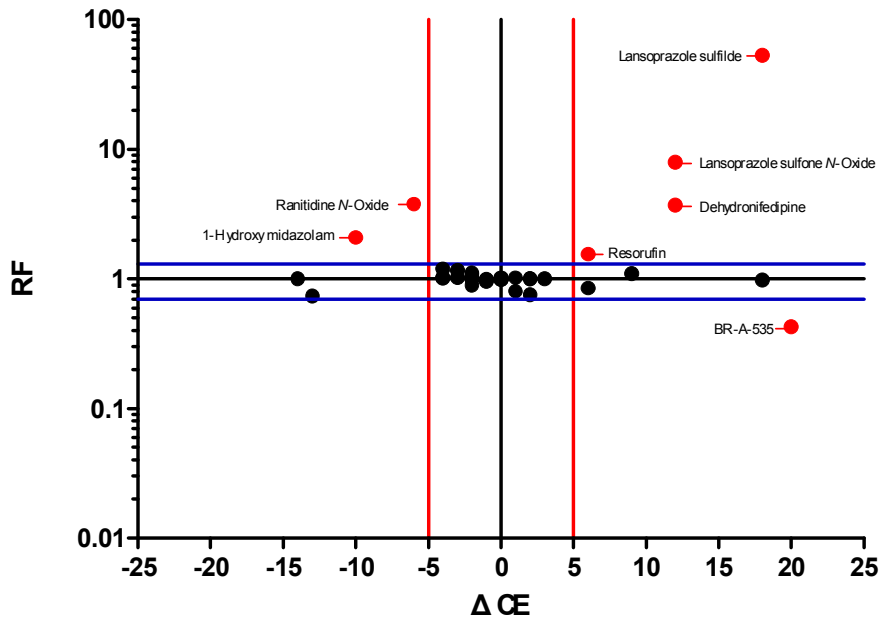


그림 9. MS 파라미터와 RF와의 상관관계. 파란선(오차 범위 $\pm 30\%$)

결론

신약개발 초기 단계에서는 대사체 표준품 합성의 어려움이 존재한다. 따라서 본 연구에서 모화합물 (28종)과 이들 물질의 phase I 반응을 통해 생성된 구조적 변화가 적은 대사체 (37종)를 선정하여 LC-MS/MS의 MRM mode을 이용해서 semi-quantification 방법의 평가 및 신뢰성 있는 검증법을 구축하고자 했다. 선정된 모화합물과 대사체의 정량분석법은 밸리데이션 가이드라인에 적합한 정량분석법을 개발하였고 이 방법으로 semi-quantification 평가를 검증하였다. 대사체를 모화합물과 대사체 각각의 MS 파라미터를 이용하여 분석 후 각 조건에 따른 이온화 정도를 area ratio로부터 얻고 이 차이는 RF 수식으로 산출하였다. 그 결과 phase I 반응으로 생성된 대사체(37개)의 81% 이상은 semi-quantification 이 잘 부합하였으며, 7개의 물질 (1-hydroxy midazolam, lansoprazole sulfone *N*-oxide, ranitidine *N*-oxide, BR-A-535, resorufin, lansoprazole sulfide, dehydronifedipine)에서 RF 값이 오차범위에 벗어났다. 오차범위를 벗어나는 물질은 모화합물과 대사체의 물리화학적, 구조적 특징 및 MS 파라미터를 비교하여 구조 변화에 따른 이온화 정도를 확인하였다. 이를 통해 pKa차이가 1 이상이거나, 조각 구조 내의 Cl 유무, *N*/*S*-oxide 등 구조적 특이성이 보이는 경우, RF 값이 오차 범위에 벗어남을 확인하였다. 또한 이와 같은 특성을 보이는 물질은 CE 값의 차이가 5 이상임을 관찰하였다. 본 연구를 통해 표준품이 없는 대사체의 semi-quantification 연구 시 모화합물과 대사체의 pKa 차이가 1이상이거나, 구조적인 특성(할로겐 원소, *N*/*S*-oxide 등)에 따라 CE값을 조정하여 분석하면 더욱 신뢰성을 얻을 수 있을 것으로 사료된다(그림 10).

향후 구조 내의 Cl 외의 다른 할로겐 원소(Br, F) 및 조각 이온의 할로겐 원소 유무에 따른 RF 비교 연구를 수행하고 추가적으로 *N/S*-oxide, reduction, dehydrogenation에 의한 구조 변화 있는 대사반응을 하는 다양한 물질을 추가하여 실험을 수행하고자 한다. Phase I 반응에서 좀더 semi-quantification 평가 방법을 신뢰성 있게 검증하여 대사체 동정 연구에서 대사체를 semi-quantification 하는 가이드라인을 구축하고자 한다.

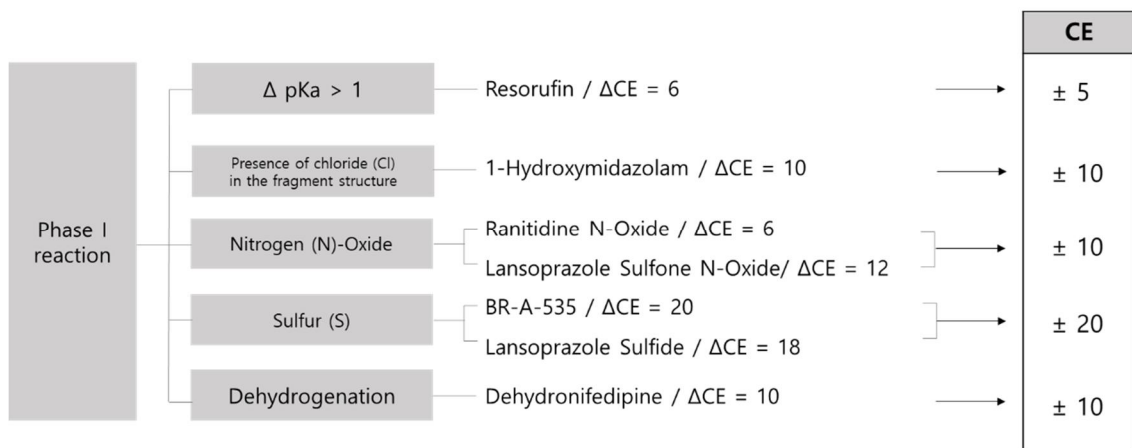


그림 10. Semi-quantification 한계 극복을 위한 고려사항

참고문헌

1. Wang, D.; Liu, W.; Shen, Z.; Jiang, L.; Wang, J.; Li, S.; Li, H., Deep Learning Based Drug Metabolites Prediction. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, 1586.
2. He, C.; Wan, H., Drug metabolism and metabolite safety assessment in drug discovery and development. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2018**, *14* (10), 1071-1085.
3. Stepan, A. F.; Mascitti, V.; Beaumont, K. C.; Kalgutkar, A. S., Metabolism-guided drug design. *MedChemComm* **2013**, *4*, 631-652.
4. Kumar, G. N.; Surapaneni, S., Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Med Res Rev* **2001**, *21* (5), 397-411.
5. Zhang, Z.; Tang, W., Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharm Sin B* **2018**, *8* (5), 721-732.
6. Baillie, T. A., Metabolism and Toxicity of Drugs. Two Decades of Progress in Industrial Drug Metabolism. *Chemical Research in Toxicology* **2008**, *21* (1), 129-137.
7. Tolstikov, V., Metabolomics: Bridging the Gap between Pharmaceutical Development and Population Health. *Metabolites* **2016**, *6* (3).
8. Issa, N. T.; Wathieu, H.; Ojo, A.; Byers, S. W.; Dakshanamurthy, S., Drug Metabolism in Preclinical Drug Development: A Survey of the Discovery Process, Toxicology, and Computational Tools. *Curr Drug Metab* **2017**, *18* (6), 556-565.
9. Andersen, M. E., Saturable metabolism and its relationship to toxicity. *Crit Rev Toxicol* **1981**, *9* (2), 105-50.

10. Esteves, F.; Rueff, J.; Kranendonk, M., The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism-A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family. *J Xenobiot* **2021**, *11* (3), 94-114.
11. Wienkers, L. C.; Heath, T. G., Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4* (10), 825-33.
12. Garza, A. Z.; Park, S. B.; Kocz, R., Drug Elimination. StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), **2021**.
13. Phang-Lyn, S.; Llerena, V. A., Biochemistry, Biotransformation. StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), **2021**.
14. Sinha, S.; Vohora, D., Drug Discovery and Development. **2018**, 19-32.
15. Lin, J. H.; Lu, A. Y., Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev* **1997**, *49* (4), 403-49.
16. Yengi, L. G.; Leung, L.; Kao, J., The evolving role of drug metabolism in drug discovery and development. *Pharm Res* **2007**, *24* (5), 842-58.
17. Lu, Y.; Chen, C., Metabolomics: Bridging Chemistry and Biology in Drug Discovery and Development. *Current Pharmacology Reports* **2017**, *3* (1), 16-25.
18. U.S. Food and Drug Administration Guidance for Industry: Safety Testing of Drug Metabolites. **2008**.
19. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3 (R2). **2009**.

20. Timmerman, P. et al., Best practices for metabolite quantification in drug development: updated recommendation from the European Bioanalysis Forum. *Bioanalysis* **2016**, *8* (12), 1297-305.
21. Schadt, S. et al., A Decade in the MIST: Learnings from Investigations of Drug Metabolites in Drug Development under the "Metabolites in Safety Testing" Regulatory Guidance. *Drug Metab Dispos* **2018**, *46* (6), 865-878.
22. Chalcraft, K. R.; Lee, R.; Mills, C.; Britz-McKibbin, P., Virtual quantification of metabolites by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: predicting ionization efficiency without chemical standards. *Anal Chem* **2009**, *81* (7), 2506-15.
23. Gao, C.; Zheng, T., Drug metabolite synthesis by immobilized human FMO3 and whole cell catalysts. *Microb Cell Fact* **2019**, *18* (1), 133.
24. Haneef, J. et al., Application of LC-MS/MS for quantitative analysis of glucocorticoids and stimulants in biological fluids. *J Pharm Anal* **2013**, *3* (5), 341-348.
25. Xiao, J. F.; Zhou, B.; Ransom, H. W., Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends Analyt Chem* **2012**, *32*, 1-14.
26. Yang, Q. et al., Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review. *RSC Advances* **2019**, *9* (64), 37245-37257.
27. Reddy, G. N.; Laltanpuii, C.; Sonti, R., Review on in vivo profiling of drug metabolites with LC-MS/MS in the past decade. *Bioanalysis* **2021**, *13* (22), 1697-1722.

28. Haag, A. M., Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Adv Exp Med Biol* **2016**, *919*, 157-169.
29. Zheng, X. et al., Utilizing ion mobility spectrometry and mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers and their metabolites. *Anal Chim Acta* **2018**, *1037*, 265-273.
30. Wang, C., The ionization technology of LC-MS, advantages of APPI on detection of PPCPs and hormones. *Austin Chromatogr* **2015**, *2* (2), 1032.
31. Wang, Y.; Sun, J.; Qiao, J.; Ouyang, J.; Na, N., A "Soft" and "Hard" Ionization Method for Comprehensive Studies of Molecules. *Analytical Chemistry* **2018**, *90* (24), 14095-14099.
32. Banerjee, S.; Mazumdar, S., Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem* **2012**, *2012*, 282574.
33. Parr, M. K.; Wüst, B.; Teubel, J.; Joseph, J. F., Splitless hyphenation of SFC with MS by APCI, APPI, and ESI exemplified by steroids as model compounds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2018**, *1091*, 67-78.
34. Lin, S. Y.; Hsu, W. H.; Lin, C. C.; Chen, C. J., Mass spectrometry-based proteomics in Chest Medicine, Gerontology, and Nephrology: subgroups omics for personalized medicine. *Biomedicine (Taipei)* **2014**, *4* (4), 25.
35. You, J.; Willcox, M. D.; Madigan, M. C.; Wasinger, V.; Schiller, B.; Walsh, B. J.; Graham, P. H.; Kearsley, J. H.; Li, Y., Tear fluid protein biomarkers. *Adv Clin Chem* **2013**, *62*, 151-96.

36. Fu, X.; Anderson, M.; Wang, Y.; Zimring, J. C., LC-MS/MS-MRM-Based Targeted Metabolomics for Quantitative Analysis of Polyunsaturated Fatty Acids and Oxylipins. *Methods Mol Biol* **2019**, *1978*, 107-120.
37. Limjiasahapong, S. et al., UPLC-ESI-MRM/MS for Absolute Quantification and MS/MS Structural Elucidation of Six Specialized Pyranonaphthoquinone Metabolites From *Ventilago harmandiana*. *Front Plant Sci* **2020**, *11*, 602993.
38. Chen, W. et al., A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics. *Mol Plant* **2013**, *6* (6), 1769-80.
39. Singh, A.; Bajpai, V.; Kumar, S.; Singh Rawat, A. K.; Kumar, B., Analysis of isoquinoline alkaloids from *Mahonia leschenaultia* and *Mahonia napaulensis* roots using UHPLC-Orbitrap-MS(n) and UHPLC-QqQ(LIT)-MS/MS. *J Pharm Anal* **2017**, *7* (2), 77-86.
40. Liu, X.; Jia, L., The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and in vivo studies. *Curr Drug Metab* **2007**, *8* (8), 815-21.
41. Dahal, U. P.; Jones, J. P.; Davis, J. A.; Rock, D. A., Small molecule quantification by liquid chromatography-mass spectrometry for metabolites of drugs and drug candidates. *Drug Metab Dispos* **2011**, *39* (12), 2355-60.
42. Ottaviani, J. I.; Fong, R. Y.; Borges, G.; Schroeter, H.; Crozier, A., Use of LC-MS for the quantitative analysis of (poly)phenol metabolites does not necessarily yield accurate results: Implications for assessing existing data and conducting future research. *Free Radic Biol Med* **2018**, *124*, 97-103.

43. Hatsis, P.; Waters, N. J.; Argikar, U. A., Implications for Metabolite Quantification by Mass Spectrometry in the Absence of Authentic Standards. *Drug Metab Dispos* **2017**, *45* (5), 492-496.
44. Blanz, J.; Williams, G.; Dayer, J.; Délémonté, T.; Gertsch, W.; Ramstein, P.; Aichholz, R.; Trunzer, M.; Pearson, D., Evaluation of relative MS response factors of drug metabolites for semi-quantitative assessment of chemical liabilities in drug discovery. *J Mass Spectrom* **2017**, *52* (4), 210-217.
45. Cramer, C. J.; Johnson, J. L.; Kamel, A. M., Prediction of Mass Spectral Response Factors from Predicted Chemometric Data for Druglike Molecules. *J Am Soc Mass Spectrom* **2017**, *28* (2), 278-285.
46. Hermans, J.; Ongay, S.; Markov, V.; Bischoff, R., Physicochemical Parameters Affecting the Electrospray Ionization Efficiency of Amino Acids after Acylation. *Anal Chem* **2017**, *89* (17), 9159-9166.
47. Korea Food & Drug Administration (KFDA), The Handbook for the Method Validation Guidelines about Drug Products. **2015**.
48. Wang, T.; Liigand, J.; Frandsen, H. L.; Smedsgaard, J.; Kruve, A., Standard substances free quantification makes LC/ESI/MS non-targeted screening of pesticides in cereals comparable between labs. *Food Chem* **2020**, *318*, 126460.
49. Kruve, A.; Kaupmees, K.; Liigand, J.; Leito, I., Negative electrospray ionization via deprotonation: predicting the ionization efficiency. *Anal Chem* **2014**, *86* (10), 4822-30.
50. U.S. Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. **2018**.

부 록

부록 1. 대사체 RF의 값

Biotransformatio	Metabolite	Mass parameters (Parent compound)					Mass parameters (metabolite)					RF
		1	2	3	mean	SD	1	2	3	mean	SD	
Oxidation	Hydroxybupropion	13.8	13.8	13.6	13.7	0.1	10.4	10.4	10.3	10.4	0.1	0.75
	1-Hydroxy midazolam	4.3	4.5	4.4	4.4	0.1	9.1	9.3	9.2	9.2	0.1	2.09
	6β-Hydroxy testosterone	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	1.00
	6a-Hydroxy paclitaxel	2.6	2.5	2.7	2.6	0.1	2.6	2.6	2.7	2.6	0.0	1.01
	6-hydroxy bupirone	65.9	67.7	68.3	67.3	1.3	65.9	66.7	67.5	66.7	0.8	0.99
	8-Hydroxy mianserin	5.9	5.9	5.9	5.9	0.0	5.0	5.0	5.0	5.0	0.0	0.85
	2-Hydroxy imipramine	24.9	25.0	24.1	24.7	0.5	24.3	24.0	24.7	24.3	0.3	0.99
	5-Hydroxy lansoprazole	3.2	3.2	3.3	3.2	0.1	3.3	3.2	3.4	3.3	0.1	1.02
	Lansoprazole sulfone <i>N</i> -Oxide	1.2	1.2	1.2	1.2	0.0	9.7	9.5	9.5	9.6	0.1	7.97
	4-Hydroxy tamoxifen	18.3	19.4	19.3	19.0	0.6	18.1	18.9	18.8	18.6	0.4	0.98
	Fenbendazole sulfoxide	4.8	4.9	4.9	4.9	0.1	3.9	3.9	3.9	3.9	0.0	0.80
	Ranitidine <i>N</i> -Oxide	2.3	2.4	2.4	2.3	0.0	8.6	9.1	9.1	8.9	0.3	3.77
	Ranitidine <i>S</i> -Oxide	1.7	1.7	1.8	1.7	0.1	1.7	1.8	1.8	1.7	0.0	1.00
Ranitidine <i>N,S</i> -Dioxide	3.4	3.5	3.5	3.5	0.1	3.4	3.4	3.6	3.5	0.1	1.02	

부록 1. 대사체 RF의 값 (계속)

Biotransformatio	Metabolite	Mass parameters (Parent compound)					Mass parameters (metabolite)					RF
		1	2	3	mean	SD	1	2	3	mean	SD	
Oxidation	7-Hydroxy coumarin	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	1.00
	4-Hydroxy tolbutamide	6.2	6.1	6.3	6.2	0.1	6.2	6.1	6.2	6.2	0.1	0.99
	6-hydroxy chlorzoxazone	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	1.00
	4'-Hydroxy diclofenac	1.5	1.5	1.5	1.5	0.0	1.6	1.6	1.7	1.7	0.1	1.09
	3'-hydroxy-4'-methoxy diclofenac	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	1.00
	4-Hydroxy warfarin	6.2	6.3	6.1	6.2	0.1	5.5	5.6	5.5	5.5	0.1	0.89
	6-hydroxy warfarin	5.9	6.1	5.9	6.0	0.1	6.0	6.2	6.0	6.1	0.1	1.02
	2- hydroxy butyl FMS	0.7	0.7	0.7	0.7	0.0	0.7	0.8	0.8	0.8	0.0	1.10
	BR-A-535	5.1	5.3	5.1	5.2	0.1	2.2	2.2	2.2	2.2	0.0	0.43
Dealkylation	Acetaminophen	1.2	1.2	1.2	1.2	0.0	1.4	1.4	1.4	1.3	0.0	1.17
	N-desethyl amodiaquine	2.6	2.7	2.7	2.7	0.1	2.6	2.8	2.8	2.7	0.1	1.03
	2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline	24.5	25.4	25.1	25.0	0.5	23.4	25.5	24.9	24.6	1.1	0.98
	O-desmethyl metoclopramide	77.0	78.6	79.7	78.4	1.4	92.9	92.8	95.7	93.8	1.6	1.20
	Resorufin	1.2	1.2	1.2	1.2	0.0	1.9	1.9	1.8	1.9	0.0	1.56

부록 1. 대사체 RF의 값 (계속)

Biotransformatio	Metabolite	Mass parameters (Parent compound)					Mass parameters (metabolite)					RF
		1	2	3	mean	SD	1	2	3	mean	SD	
Dealkylation	Berberrubine	45.6	44.7	43.5	44.6	1.1	45.7	44.8	43.3	44.6	1.2	1.00
	Demethyleneberberine	5.8	5.8	5.2	5.6	0.4	5.4	5.6	5.1	5.4	0.3	0.96
	N-Desmethyl clarithromycin	19.7	19.9	20.0	19.9	0.2	21.9	22.0	22.4	22.1	0.3	1.11
	Norverapamil	40.5	39.9	40.5	40.3	0.3	40.8	40.8	41.6	41.1	0.5	1.02
	Dextrorphan	22.9	23.6	23.0	23.2	0.4	16.8	17.1	17.3	17.1	0.2	0.74
	N-Desmethyl imatinib	5.6	5.8	5.9	5.8	0.1	5.6	5.7	5.8	5.7	0.1	0.99
Reduction	Lansoprazole sulfide	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	22.7	21.2	19.5	21.1	1.6	52.83
Hydrogenation	Jatrorrhizine	68.5	68.4	68.5	68.5	0.1	67.1	68.1	66.6	67.3	0.8	0.98
Dehydrogenation	Dehydronifedipine	8.2	8.1	8.7	8.3	0.3	30.8	29.9	32.4	31.0	1.2	3.72

부록 2. 모화합물과 그 대사체의 물리화학적 특성

Parent compound	pKa	logP	logD	Polar Surface Area (Å ²)	Polarizability (Å ³)	Metabolite	pKa	logP	logD	Polar Surface Area (Å ²)	Polarizability (Å ³)
Bupropion	8.22	3.27	1.87	29.10	25.66	Hydroxy bupropion	7.65	2.22	1.22	49.30	27.28
Midazolam	6.19	3.97	3.73	30.18	33.93	1-Hydroxy midazolam	4.63	3.16	2.90	50.41	34.64
Testosterone	-0.88	3.37	3.54	37.30	33.26	6β-Hydroxy testosterone	-0.88	2.13	2.32	57.53	33.88
Paclitaxel	-1.18	3.54	3.30	221.29	86.54	6a-Hydroxy paclitaxel	-1.18	2.85	2.57	241.52	87.20
bupirone	7.62	1.78	1.18	69.64	41.62	6-hydroxy bupirone	7.62	1.06	0.45	89.87	42.26
Mianserin	6.92	3.83	3.43	3.87	32.16	8-Hydroxy mianserin	6.79	3.53	3.61	26.71	32.72
Imipramine	9.20	4.28	2.21	6.48	34.67	2-Hydroxy imipramine	9.18	3.80	1.92	26.71	35.23
Lansoprazole	4.16	3.03	2.91	67.87	34.15	5-Hydroxy lansoprazole	4.16	2.70	2.62	88.10	34.82
						Lansoprazole sulfone <i>N</i> -Oxide	1.10	1.93	-0.35	98.99	35.32
						Lansoprazole sulfide	6.09	4.16	4.27	50.80	33.54
Tamoxifen	8.76	6.35	5.36	12.47	46.49	4-Hydroxy tamoxifen	8.66	5.69	5.07	32.70	47.04
Fenbendazole	4.20	3.99	4.61	67.01	32.85	Fenbendazole sulfoxide	4.00	2.62	2.62	84.08	33.58
Ranitidine	7.8	0.99	0.34	83.58	32.32	Ranitidine <i>N</i> -Oxide	3.76	-0.13	0.28	103.40	32.52
						Ranitidine <i>S</i> -Oxide	7.69	-0.82	-1.36	100.65	32.92
						Ranitidine <i>N,S</i> -Dioxide	3.76	-1.94	-1.50	120.47	33.13
Coumarin	-6.9	1.78	1.52	26.30	15.70	7-Hydroxy coumarin	-6.9	1.48	1.10	46.53	16.31
Tolbutamide	4.33	2.30	1.19	75.27	27.81	4-Hydroxy tolbutamide	4.33	1.01	-0.11	95.50	28.54
Chlorzoxazone	9.39	1.94	1.60	38.33	15.26	6-hydroxy chlorzoxazone	6.13	1.63	0.04	58.56	15.96

부록 2. 모화합물과 그 대사체의 물리화학적 특성 (계속)

Parent compound	pKa	logP	logD	Polar Surface Area (Å²)	Polarizability (Å³)	Metabolite	pKa	logP	logD	Polar Surface Area (Å²)	Polarizability (Å³)
Diclofenac	4.00	4.26	0.74	49.33	29.03	4'-Hydroxy diclofenac	3.76	3.96	0.30	69.56	29.69
						3'-hydroxy-4'-methoxy diclofenac	3.62	3.80	-0.06	78.79	32.26
Warfarin	5.56	2.74	0.78	63.6	33.34	4-Hydroxy warfarin	5.39	2.44	0.44	83.83	33.95
						6-hydroxy warfarin	5.31	2.44	0.42	83.83	33.95
Fimasartan	5.85	4.77	3.96	90.37	57.96	2- hydroxy butyl FMS	5.85	3.62	2.75	110.60	58.55
						BR-A-535	4.15	3.80	0.63	124.43	50.18
Phenacetin	-4.20	1.41	1.46	38.33	19.56	Acetaminophen	-4.36	0.91	1.08	49.33	15.82
Amodiaquine	10.23	3.8	1.95	48.39	40.89	N-desethyl amodiaquine	10.35	2.99	1.03	57.18	37.20
Prazosin	7.24	1.65	1.23	106.95	39.32	2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline	7.65	0.73	0.19	96.28	23.35
Metoclopramide	9.04	1.40	-0.56	67.59	31.28	O-desmethyl metoclopramide	9.07	0.67	-0.02	78.59	29.38
7-Ethoxyresorufin	1.43	2.28	1.64	47.89	25.25	Resorufin	6.6	1.77	0.19	58.89	21.51
Berberine	-4.63	-1.28	-1.27	40.8	38.45	Berberrubine	-4.91	-1.43	-2.36	51.80	36.53
						Demethyleneberberine	-4.63	-1.51	-1.54	62.80	37.20
						Jatrorrhizine	-4.44	-1.37	-1.49	51.80	38.00
Clarithromycin	9.00	3.24	0.19	182.91	77.66	N-Desmethyl clarithromycin	9.63	2.86	-0.78	191.70	75.83
Verapamil	9.68	5.04	2.29	63.95	51.54	Norverapamil	10.29	4.66	1.38	72.74	49.70
Dextromethorphan	9.85	3.49	0.92	12.47	32.31	Dextrorphan	9.66	2.90	0.88	23.47	30.39
Imatinib	7.84	4.38	3.25	86.28	57.10	N-Desmethyl imatinib	9.23	3.99	1.64	95.07	55.26
Nifedipine	5.33	1.82	1.64	107.77	33.98	Dehydronifedipine	3.67	2.61	3.01	108.63	34.67

부록 2. 모화합물과 그 대사체의 물리화학적 특성 (계속)

Parent compound	Molecular Volume(a.u. ³)	Contact Surface Polar HBD (Angstrom ²)	Contact Surface Polar HBA (Angstrom ²)	Contact Surface Neutral (Angstrom ²)	Contact Surface Total (Angstrom ²)	Metabolite	Molecular Volume(a.u. ³)	Contact Surface Polar HBD (Angstrom ²)	Contact Surface Polar HBA (Angstrom ²)	Contact Surface Neutral (Angstrom ²)	Contact Surface Total (Angstrom ²)
Bupropion	2010.63	4.11	16.58	243.47	262.13	Hydroxybupropion	2078.34	11.00	23.95	234.64	266.24
Midazolam	2510.47	-0.32	17.83	308.13	329.49	1-Hydroxy midazolam	2590.17	7.14	24.49	305.52	339.94
Testosterone	2521.42	7.75	25.51	270.01	302.54	6β-Hydroxy testosterone	2582.96	13.55	32.02	263.51	308.65
Paclitaxel	6460.07	27.69	77.48	570.76	661.98	6a-Hydroxy paclitaxel	6505.96	34.83	83.08	560.59	664.81
Buspirone	3354.82	2.47	37.53	379.65	419.60	6-hydroxy buspirone	3384.85	8.78	41.58	367.93	416.81
Mianserin	2300.15	0.72	8.24	283.99	290.75	8-Hydroxy mianserin	2366.97	8.83	13.40	282.02	302.39
Imipramine	2530.92	-4.42	8.55	319.66	321.95	2-Hydroxy imipramine	2597.74	3.69	13.71	317.69	333.59
Lansoprazole	2516.411	14.424	27.061	297.128	333.321	5-Hydroxy lansoprazole	2583.23	22.54	32.22	295.16	344.96
						Lansoprazole sulfone <i>N</i> -Oxide	2808.12	16.52	32.11	299.25	348.21
						Lansoprazole sulfide	2447.27	12.79	14.67	299.71	324.61
Tamoxifen	3188.28	-2.12	7.75	396.58	402.64	4-Hydroxy tamoxifen	3255.10	5.99	12.91	394.61	414.28
Fenbendazole	2301.05	20.43	24.40	270.83	313.67	Fenbendazole sulfoxide	2398.71	21.60	41.06	256.14	324.10
Ranitidine	2483.496	12.345	31.323	285.558	325.472	Ranitidine <i>N</i> -Oxide	2336.09	5.77	24.03	244.75	274.35
						Ranitidine <i>S</i> -Oxide	2478.73	12.98	38.51	267.62	314.13
						Ranitidine <i>N,S</i> -Dioxide	2331.33	6.41	31.21	226.81	263.00
Coumarin	1206.84	4.07	15.63	171.46	190.22	7-Hydroxy coumarin	1273.65	12.19	20.79	169.49	201.86
Tolbutamide	2090.92	17.48	36.42	248.13	298.51	4-Hydroxy tolbutamide	2177.99	24.83	44.61	246.95	313.14
Chlorzoxazone	1251.86	12.03	14.77	179.35	204.90	6-hydroxy chlorzoxazone	1326.54	20.74	18.61	175.03	212.34
Diclofenac	2218.564	18.785	14.52	269.045	300.583	4'-Hydroxy diclofenac	2285.38	26.90	19.68	267.08	312.22
						3'-hydroxy-4'-methoxy diclofenac	2498.57	27.47	22.54	282.72	330.94

부록 2. 모화합물과 그 대사체의 물리화학적 특성 (계속)

Parent compound	Molecular Volume(a.u. ³)	Contact Surface Polar HBD (Angstrom ²)	Contact Surface Polar HBA (Angstrom ²)	Contact Surface Neutral (Angstrom ²)	Contact Surface Total (Angstrom ²)	Metabolite	Molecular Volume(a.u. ³)	Contact Surface Polar HBD (Angstrom ²)	Contact Surface Polar HBA (Angstrom ²)	Contact Surface Neutral (Angstrom ²)	Contact Surface Total (Angstrom ²)
Warfarin	2445.993	10.817	25.774	287.569	320.438	4-Hydroxy Warfarin	2512.81	18.93	30.93	285.60	332.08
						6-hydroxy Warfarin	2512.81	18.93	30.93	285.60	332.08
Fimasartan	4065.181	12.045	39.325	417.918	472.15	2-OH butyl FMS	4142.86	17.81	45.94	410.58	478.05
						BR-A-535	3677.61	21.03	45.95	376.77	442.05
Phenacetin	1452.95	11.56	22.96	195.93	232.11	Acetaminophen	1209.77	19.16	22.85	155.43	198.86
Amodiaquine	2751.03	13.50	16.20	332.46	361.65	N-desethylamodiaquine	2559.61	16.47	18.79	309.78	345.02
Prazosin	2956.42	14.03	33.03	349.07	394.17	2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline	1670.94	25.99	27.68	196.89	253.35
Metoclopramide	2281.49	15.46	26.84	287.99	329.59	O-desmethyl Metoclopramide	2138.97	23.30	26.79	261.93	311.98
7-Ethoxyresorufin	1862.09	3.55	26.25	254.76	281.58	Resorufin	1618.91	11.15	26.13	214.27	248.33
Berberine	2643.001	5.879	20.531	313.793	341.065	Berberrubine	2500.47	13.72	20.48	287.74	323.45
						Demethyleneberberine	2553.42	18.90	25.52	289.71	335.11
						Jatrorrhizine	2695.95	11.07	25.57	315.76	352.73
Clarithromycin	5834.97	18.37	73.74	520.72	602.73	N-DesmethylClarithromycin	5720.63	21.08	76.17	507.33	595.43
verapamil	3887.46	-0.37	31.31	469.67	499.87	Norverapamil	3773.12	2.35	33.74	456.28	492.57
Dextromethorphan	2302.50	1.24	12.95	281.99	298.20	Dextrorphan	2159.97	9.08	12.90	255.94	280.58
Imatinib	4071.04	18.09	38.03	455.67	510.35	N-Desmethyl Imatinib	3956.71	20.80	40.46	442.27	503.05
Nifedipine	2725.47	11.22	34.43	297.11	339.89	Dehydronifedipine	2591.76	4.62	33.41	292.20	329.38

부록 2. 모화합물과 그 대사체의 물리화학적 특성 (계속)

Parent compound	logS	Boiling Point (K)	Henry's Law Constant (log ₁₀ (atm m ³ /mol))	Hydroxyl Radical Attack (log ₁₀ (cm ³ /mol·sec))	Melting Point (K)	Vapor Pressure (log ₁₀ (mm Hg))	Metabolite	logS	Boiling Point (K)	Henry's Law Constant (log ₁₀ (atm m ³ /mol))	Hydroxyl Radical Attack (log ₁₀ (cm ³ /mol·sec))	Melting Point (K)	Vapor Pressure (log ₁₀ (mm Hg))
Bupropion	-2.83	495.39	-7.63	-10.79	342.83	-3.26	Hydroxybupropion	-2.46	552.05	-11.72	-10.37	371.34	-5.63
Midazolam	-5.08	658.76	-9.70	-10.37	436.80	-8.21	1-Hydroxy midazolam	-4.67	687.03	-12.23	-10.16	457.69	-9.29
Testosterone	-4.24	618.56	-9.09	-9.60	413.15	-5.51	6β-Hydroxy testosterone	-3.39	630.69	-12.39	-9.45	437.74	-6.58
Paclitaxel	-7.63	949.55	-30.62	-6.18	698.48	-27.48	6α-Hydroxy paclitaxel	-7.60	991.47	-34.41	-5.86	732.08	-29.46
Buspirone	-3.19	557.66	-14.60	-9.49	395.46	-10.94	6-hydroxy buspirone	-2.85	560.52	-17.42	-9.09	428.18	-11.81
Mianserin	-2.96	438.86	-4.57	-9.71	324.08	-5.38	8-Hydroxy mianserin	-2.67	488.51	-8.37	-9.11	379.02	-7.12
Imipramine	-3.28	508.74	-7.32	-8.54	303.88	-3.85	2-Hydroxy imipramine	-2.99	558.40	-11.15	-7.95	352.82	-5.58
Lansoprazole	-3.246	576.939	-10.077	-11.044	404.062	-7.273	5-Hydroxy lansoprazole	-2.96	626.60	-13.90	-10.45	459.00	-9.01
							Lansoprazole sulfone <i>N</i> -Oxide	-4.53	634.12	-9.38	-11.52	478.90	-8.17
							Lansoprazole sulfide	-4.18	565.91	-9.92	-11.26	442.37	-7.46
Tamoxifen	-6.64	722.09	-8.01	-8.21	381.84	-9.54	4-Hydroxy tamoxifen	-6.35	771.75	-11.83	-7.61	436.78	-11.28
Fenbendazole	-5.13	699.68	-11.16	-10.70	469.68	-15.23	Fenbendazole sulfoxide	-3.83	636.65	-10.51	-10.58	525.51	-9.86
Ranitidine	-2.872	544.902	-10.839	-7.658	355.298	-8.203	Ranitidine <i>N</i> -Oxide	-2.91	609.71	-9.09	-8.84	471.25	-6.50
							Ranitidine <i>S</i> -Oxide	-1.33	561.77	-14.14	-7.07	419.49	-9.29
							Ranitidine <i>N,S</i> -Dioxide	-1.37	626.58	-12.40	-8.25	535.44	-7.58
Coumarin	-2.81	505.67	-5.02	-10.63	331.37	-1.58	7-Hydroxy coumarin	-2.52	555.33	-8.85	-10.03	386.31	-3.32
Tolbutamide	-3.39	557.05	-8.49	-10.16	379.48	-6.56	4-Hydroxy tolbutamide	2.47	575.46	-12.22	-10.04	415.49	-8.25
Chlorzoxazone	-3.11	477.08	-4.61	-11.23	377.39	-3.04	6-hydroxy chlorzoxazone	-2.70	522.55	-8.31	-10.68	430.50	-4.71
Diclofenac	-3.852	658.73	-10.32	-10.351	412.385	-8.207	4'-Hydroxy diclofenac	-3.56	708.39	-14.14	-9.75	467.33	-9.94
							3'-hydroxy-4'-methoxy diclofenac	-3.60	724.61	-13.90	-9.47	477.77	-11.15

부록 2. 모화합물과 그 대사체의 물리화학적 특성 (계속)

Parent compound	logS	Boiling Point (K)	Henry's Law Constant (log ₁₀ (atm·m ³ /mol))	Hydroxyl Radical Attack (log ₁₀ (cm ³ /mol·sec))	Melting Point (K)	Vapor Pressure (log ₁₀ (mm Hg))	Metabolite	logS	Boiling Point (K)	Henry's Law Constant (log ₁₀ (atm·m ³ /mol))	Hydroxyl Radical Attack (log ₁₀ (cm ³ /mol·sec))	Melting Point (K)	Vapor Pressure (log ₁₀ (mm Hg))
Warfarin	-3.798	665	-10.12	-10.451	427.942	-8.287	4-Hydroxy warfarin	-3.51	714.66	-13.94	-9.85	482.88	-10.02
							6-hydroxy warfarin	-3.51	714.66	-13.94	-9.85	482.88	-10.22
Fimasartan	-5.76	802.555	-15.064	-8.686	498.559	-15.173	2- hydroxy butyl FMS	-4.92	832.49	-18.50	-8.49	528.62	-16.57
							BR-A-535	-5.02	824.14	-14.51	-9.30	52.19	-15.10
Phenacetin	-1.78	580.36	-8.51	-10.36	379.89	-4.37	Acetaminophen	-1.20	603.00	-11.11	-10.19	419.14	-4.78
Amodiaquine	-3.53	682.27	-15.27	-8.03	489.42	-11.88	<i>N</i> -desethyl amodiaquine	3.27	790.80	-16.10	-7.72	506.88	-12.05
Prazosin	-4.85	635.46	-13.57	-8.99	471.36	-12.98	2,4-Diamino-6,7-dimethoxyquinazoline	-2.99	633.18	-9.52	-10.39	515.85	-9.65
Metoclopramide	-2.26	601.67	-11.65	-8.62	412.15	-8.45	<i>O</i> -desmethyl metoclopramide	-1.89	623.31	-14.36	-8.33	449.93	-9.23
7-Ethoxyresorufin	-4.13	624.47	-10.92	-9.62	435.51	-6.85	Resorufin	-3.55	647.11	-13.51	-9.44	474.76	-7.26
Berberine	-4.947	653.283	-5.923	-9.00	471.862	-8.566	Berberrubine	-4.58	674.92	-8.63	-8.70	509.64	-9.35
							Demethyleneberberine	-4.13	712.83	-11.43	-8.52	524.16	-10.78
							Jatrorrhizine	-4.50	691.19	-8.72	-8.81	486.39	-9.90
Clarithromycin	-2.07	752.39	-30.72	-4.95	451.81	-19.04	<i>N</i> -Desmethyl clarithromycin	-1.94	793.98	-31.73	-4.60	466.55	-19.34
verapamil	-5.24	663.28	-7.65	8.69	374.91	-9.40	Norverapamil	-5.11	704.87	-8.66	-8.34	389.65	-9.70
Dextromethorphan	-3.27	531.55	-7.10	-9.90	369.43	-3.86	Dextrorphan	-2.90	553.19	-9.81	-9.60	407.21	-4.64
Imatinib	-4.27	800.29	-20.79	-6.62	594.43	-20.11	<i>N</i> -Desmethyl imatinib	-4.14	841.88	-21.80	-6.26	609.17	-20.40
Nifedipine	-2.27	672.06	-11.76	-12.54	456.31	-9.98	Dehydronifedipine	-3.44	744.60	-12.55	-10.79	389.55	-8.40

Abstract

Metabolism studies in early drug discovery focus on finding structurally vulnerable chemical spots of the drug to improve its pharmacokinetic properties. In the later stages, it is performed to find animal species suitable for toxicity tests that can increase the prediction in humans by comparing species differences. As the Metabolites in Safety Testing (MIST) guidelines were published, quantitative as well as qualitative analysis of these metabolites are being emphasized. However, due to the difficulty of metabolite synthesis, it is difficult to obtain a metabolite standard, so there is a limit to quantification. In this study, using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), the semi-quantification method of metabolites with relatively small structural changes generated through the phase I reaction was verified. For this purpose, it was selected 28 parent compounds and their 39 corresponding metabolites produced by phase I reaction. Total 65 compounds were quantitatively analyzed by LC-MS/MS using multiple reaction monitoring (MRM) mode and four different chromatographic columns. In addition, these methods were verified according to the Korea Food & Drug Administration (KFDA) validation guideline. The degree of ionization of each the parent compound and metabolite was calculated as an area ratio value. Metabolites were analyzed using MS parameters of the parent compound and metabolite respectively. Response Factor (RF) values were calculated using area ratio according to each condition. As a result, RF values of 30 metabolites

(about 81% of 37 metabolites) were within $\pm 30\%$ error range, except for seven substances (1-hydroxy midazolam, lansoprazole sulfone *N*-oxide, ranitidine *N*-oxide, BR-A-535, resorufin, lansoprazole sulfide and dehydronifedipine). For substances outside the error range, physicochemical and structural characteristics and MS parameters of the parent compound and its metabolites were compared to determine the cause of the change in the degree of ionization according to the structural change. In conclusion, it was confirmed that ionization conditions of the parent compound and the metabolite were greatly changed when the difference in pKa values between the parent compound and the metabolite was greater than 1, chloride (Cl) was included in the fragment ion structure, or a structural specificity such as N-/S-oxide was present. It was observed that the difference in collision energy (CE) values among the optimized MS parameters of the parent compound and its metabolites was greater than 5 in the presence of these physicochemical and structural characteristics. Taken together, the above results suggest that in order to overcome the semi-quantification limit of metabolites, it is particularly important to identify the physicochemical and structural characteristics of metabolites and to adjust CE values according to structural features.